



**Форма направления реферативно-библиографических сведений
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и
технологической работы**

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119040290078-3	02/04/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

-Механизмы регуляции раннего онтогенеза: гаметогенез, оплодотворение и раннее развитие животных

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Озернюк Н.Д.	Доктор биологических наук	Профессор
--------------	---------------------------	-----------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090130-0	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОНТОГЕНЕЗА: ГАМЕТОГЕНЕЗ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ, ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЖИВОТНЫХ Раздел № 50 «Биология развития и эволюция живых систем» Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. (заключительный отчет)

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.21.15; 34.21.17; 34.15.61	611.013.1/2 591.3
------------------------------	-------------------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

76

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/78	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

1

Иллюстраций

21

Библиография

95

Публикаций по результатам НИОКТР

19

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.	Директор	00133521977	
----------------	----------	-------------	--



Место для печати

ФГАНУ «Центр информационных технологий
и систем органов исполнительной власти»
Зарегистрировано в государственном
информационном фонде неопубликованных
документов

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

УДК 611.013.1/2 591.3

Per. № ГЗ 0108-2019-0003

Per. № НИОКТР АААА-А19-119040290078-3



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОНТОГЕНЕЗА: ГАМЕТОГЕНЕЗ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ,
ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЖИВОТНЫХ

Раздел № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»

Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук,
профессор

Н.Д. Озернюк

подпись, дата

26.12.2019

Москва 2019

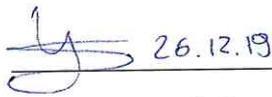
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук,
профессор

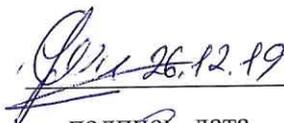
 26.12.19 Н.Д. Озернюк (Введение,
подпись, дата раздел 5)

Исполнители:

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 26.12.19 А.Ю. Кулибин (раздел 1)
подпись, дата

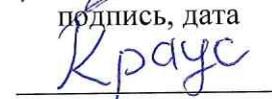
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 26.12.19 Д.А. Никишин (раздел 2)
подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук

 26.12.19 Ю.Б. Шмуклер (раздел 2)
подпись, дата

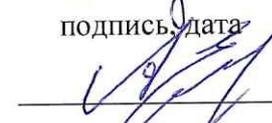
Главный научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 26.12.19 Ю.А. Краус (раздел 3)
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 26.12.19 С.В. Кремнёв (раздел 3)
подпись, дата

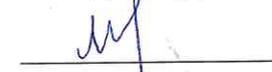
Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук

 26.12.19 А.В. Ересковский (раздел 3)
подпись, дата

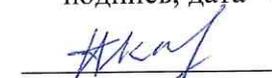
Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук

 26.12.19 А.А. Зотин (раздел 4)
подпись, дата

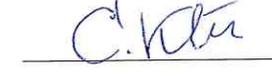
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 М.В. Нечаева (раздел 5)
подпись, дата 24.12.2019

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 А.М. Красный (раздел 6)
подпись, дата 26.12.19

Ведущий научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 С.Ю. Клейменов (раздел 7)
подпись, дата 26.12.19

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук

 26.12.19 Е.Б. Абрамова
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 76 с., 7 разд., 21 рис., 1 табл., 95 источников, 19 публикаций по теме.

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ РАЗВИТИЯ, ГАМЕТОГЕНЕЗ, СПЕРМИОГЕНЕЗ, Фолликулогенез, Морфогенез, ПЛАН СТРОЕНИЯ, РОСТ, ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН, ПАТОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ, СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ

Цель работы - выявление механизмов регуляции онтогенетических процессов на разных этапах развития и на разных уровнях организации. Исследование выполнялось на широком круге объектов, позволяющих охарактеризовать механизмы регуляции гаметогенеза, эмбрионального и постэмбрионального развития животных, с использованием подходов морфологии, экспериментальной, эволюционной и экологической биологии развития, генетики развития, клеточной и молекулярной биологии.

Регуляция гаметогенеза исследована на популяции Сертоли-подобных клеток (СПК) семенника и растущих фолликулах яичника мыши. Показано, что постнатальные изменения СПК инициируются тиреоидным гормоном Т3. Установлено, что СПК способствуют активации мейотического пути в половых клетках, то есть их дифференцировке. Выявлено, что основным механизмом, обеспечивающим серотонинергическую регуляцию овариального фолликулогенеза, является захват материнского серотонина яйцеклетками с помощью мембранного транспортера SERT. Реконструирован ряд эволюционно-первичных механизмов регуляции развития, в том числе молекулярные механизмы формирования плана строения колониальных животных. Экспериментально показано, что разметка колонии в типе Cnidaria основана на работе ключевых компонентов cWnt каскада. Изменение активности cWnt каскада приводит к радикальному изменению плана строения колонии. Показано, что основную роль в репаративной регенерации губок играет механизм трансдифференцировки клеток, который можно считать эволюционно первичным. Экспериментальными и математическими методами исследованы ростовые процессы, энергетический обмен и устойчивость процессов развития в онтогенезе моллюсков и позвоночных животных. Выявлен ряд маркеров, позволяющих оценивать риск нарушения инвазии трофобласта, ведущей к развитию плацентарной дисфункции и преэклампсии. Выполнено изучение связи структурной стабильности с функциональными свойствами белковых молекул. Охарактеризованы мутации тропомиозина млекопитающих, снижающие его термостабильность и приводящие к кардиомиопатологиям.

Полученные результаты являются принципиально новыми и опубликованы в рецензируемых научных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ.....	10
1.1 Введение.....	10
1.2 Материалы и методы.....	10
1.3 Результаты и обсуждение.....	12
1.4 Заключение.....	16
1.5 Список использованных источников.....	16
РАЗДЕЛ 2. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ.....	18
2.1 Введение.....	18
2.2 Материалы и методы.....	19
2.3 Результаты и обсуждение.....	20
2.4 Заключение.....	26
2.5 Список использованных источников.....	27
РАЗДЕЛ 3. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА В РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ.....	30
3.1 Введение.....	30
3.2 Материалы и методы.....	33
3.3 Результаты и обсуждение.....	37
3.4 Заключение.....	43
3.5 Список использованных источников.....	44
РАЗДЕЛ 4. ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА.....	48
4.1 Введение.....	48
4.2 Материалы и методы.....	50
4.3 Результаты и обсуждение.....	52
4.4 Заключение.....	55

4.5 Список использованных источников.....	56
РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ГИПОКСИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ) НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ. ПОИСК АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.....	59
5.1 Введение.....	59
5.2 Материалы и методы.....	59
5.3 Результаты и обсуждение.....	60
5.4 Заключение.....	61
5.5 Список использованных источников.....	61
РАЗДЕЛ 6. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ.....	62
6.1 Введение.....	62
6.2 Материалы и методы.....	62
6.3 Результаты и обсуждение	62
6.4 Заключение	64
6.5 Список использованных источников	65
РАЗДЕЛ 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БИОМОЛЕКУЛ.....	66
7.1 Введение.....	66
7.2 Материалы и методы.....	67
7.3 Результаты и обсуждение.....	67
7.4 Заключение	68
7.5 Список использованных источников	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2019 ГОД.....	74

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ВР - верхушка роста

КЛСМ - конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КС - клетки Сертоли

ПЦР - полимеразная цепная реакция

СПК - Сертоли-подобные клетки,

ССК - сперматогониальные стволовые клетки

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

ЧСС - частота сердечных сокращений

CDH1 - кадгерин-1

cWnt - канонический Wnt сигнальный путь

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DDX4 - DEAD-Box хеликаза 4

DMRT1 - doublesex и mab-3 связанный транскрипционный фактор 1

dpp - дни после рождения

EdU - 5-Этинил-2'-дезоксисуридин

EGF - эпидермальный фактор роста

FBS - фетальная бычья сыворотка

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

FLU - флуоксетин

FNSW - профильтрованная природная морская вода

GDNF - глиальный нейротрофический фактор

GFP - зеленый флуоресцентный белок

GV - зародышевый пузырек

hpo - часы после операции

5HT - 5-гидрокситриптамин (серотонин)

HTP - 5-гидрокситриптофан

IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста 1

ITS - добавка инсулин-трансферрин-селенит

KSR - knock-out заменитель сыворотки

LIF - лейкемия-ингибирующий фактор роста

MEF - мышечные эмбриональные фибробласты
NSW - природная морская вода
PBS - фосфатный буфер
PFA - параформальдегид
PTU - 6-пропил-2-тиоурацил (ингибитор синтеза тиреоидного гормона)
PTw - PBS и Tween
RA - ретиноевая кислота
RQ - относительное количество
SCP3 - белок синаптонемного комплекса 3
SOX9 - SRY-Box транскрипционный фактор 9
STRA8 - белок, стимулируемый ретиноевой кислотой 8
T3 - тиреоидный гормон
YAC - комплекс низкомолекулярных ингибиторов Y-27632, A-83-01 и CHIR99021

ВВЕДЕНИЕ

Выявление фундаментальных механизмов регуляции онтогенеза, обеспечивающих устойчивость развивающейся системы – одна из важнейших задач современной биологии развития. Данное исследование посвящено выяснению особенностей регуляции последовательных этапов онтогенеза на молекулярном, клеточном и организменном уровнях организации. Уникальность исследования состоит в использовании широкого круга модельных объектов, от базальных многоклеточных до позвоночных животных. Это позволяет с помощью сравнительного анализа решать задачу реконструкции этапов эволюции регуляторных механизмов онтогенеза. Кроме того, исследование объединяет последовательные этапы онтогенеза, от гаметогенеза до постнатального развития, что позволяет выявлять особенности регуляторных механизмов, характерных для каждой из этих стадий.

Исследование регуляторных механизмов гаметогенеза позвоночных животных позволяет разработать методы наиболее точной и направленной его регуляции, то есть методы терапии мужского и женского бесплодия человека. В этом отношении многообещающим направлением является детальное изучение клеток Сертоли (КС), соматических клеток в мужских гонадах млекопитающих, поддерживающих развитие половых клеток. КС во взрослом состоянии являются дифференцированными, непролиферирующими клетками, неспособными к восстановлению после повреждения. Однако нашим коллективом обнаружена популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), которые, в отличие от КС, способны к активной пролиферации в культуре. Изучение СПК важно для понимания процессов развития семенника и механизмов их нарушений при различных патологиях.

Другое актуальное направление в исследованиях гаметогенеза позвоночных – изучение регуляторной роли моноаминергических трансммиттеров. Среди них выделяется серотонин, как трансммиттер, обладающий наибольшим числом описанных функций вне нервной системы – как в эмбриональном развитии, так и во взрослых организмах. Для выявления главных источников серотонина в ткани яичника мыши проводились исследования экспрессии и функциональной активности ферментов синтеза серотонина и его мембранного серотонина SERT.

Изучение разнообразия и эволюционной истории молекулярно-генетических и клеточных механизмов, обеспечивающих устойчивое формирование планов строения животных, важно для лучшего понимания причин и последствий нарушений развития,

приводящих к тяжелым врожденным патологиям. Базальные Metazoa представляют собой таксоны, ответвившиеся от ствола филогенетического дерева вскоре после появления многоклеточных животных. Они с высокой вероятностью сохранили в онтогенезе эволюционно первичные механизмы разметки осей тела, регуляции морфогенезов, восстановления целостности организма при повреждениях. Именно поэтому представители Porifera и Cnidaria – идеальные объекты для реконструкции эволюционной истории регуляторных механизмов развития. Исследования по выявлению молекулярных механизмов, регулирующих пространственную разметку, рост и ветвление колоний проводились на морском гидроиде *Dynamena pumila*. Для характеристики процессов пролиферации, апоптоза, миграции клеток и морфогенеза и детального изучения клеточных механизмов репаративной регенерации Porifera использовали вид губки *Aplysina cavernicola*.

В рамках исследования механизмов, обеспечивающих устойчивость процессов развития на организменном уровне, анализировались новые данные об общих закономерностях и видовых особенностях роста и энергетического обмена у моллюсков и амфибий. Кроме того, изучались механизмы устойчивости эмбрионов позвоночных к гипоксии; проводился поиск маркеров, позволяющих прогнозировать нарушение инвазии трофобласта, ведущее к преэклампсии у человека.

Структурная стабильность макромолекул - важнейший механизм, обеспечивающий устойчивость процессов развития на молекулярном уровне. Изучение связи структурной стабильности с функциональными свойствами молекул имеет большое значение в диагностике некоторых заболеваний и последующем принятии плана терапии. Причиной изменения функциональных свойств белков могут быть аминокислотные замены в той части молекулы, которая формирует её вторичную и третичную структуру. Исследования структурной стабильности макромолекул проводились на модели влияния миопатических мутаций тропомиозина на термостабильность и энтальпию денатурации доменов этого белка.

Решение экспериментальных задач всех заявленных тематик исследования позволяет получить ряд новых и уникальных данных для опубликования в рейтинговых профильных журналах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ

1.1 Введение

Клетки Сертоли (КС), соматические клетки в мужских гонадах млекопитающих, поддерживающие развитие половых клеток, во взрослом состоянии являются дифференцированными, непролиферирующими клетками, неспособными к восстановлению после повреждения [1]. Однако, согласно ряду исследований [2], КС половозрелых животных и человека способны к пролиферации или экспрессии недифференцированных маркеров, таких как кератин 18, при тепловом воздействии [3], при изменении гормонального фона [4] и при выведении в культуру [5]. Последнее подробно изучено нами ранее. Было установлено, что небольшое число КС извитых семенных канальцев мыши действительно способно к пролиферации в культуре, но она ограничивается всего одним или двумя раундами [6-7]. Однако нами обнаружена популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), которые, в отличие от КС, способны к активной пролиферации в культуре [6]. СПК локализируются в сети семенника, системе полостей и каналов, соединяющих извитые семенные канальцы с семявыносящими путями [8]. Эти клетки экспрессируют многие гены, специфические для КС, и, по-видимому, имеют с ними общее происхождение. Дальнейшее изучение популяции СПК важно для понимания процессов развития семенника и дифференцировки КС, а также для раскрытия механизмов нарушений дифференцировки КС при различных патологиях и формирования новообразований (опухолей) из соматических клеток семенника.

Целью настоящего этапа работы стало изучение факторов, влияющих на дифференцировку СПК в постнатальном развитии мыши, и исследование воздействия СПК на дифференцировку половых клеток *in vitro*. Задачи исследования: оценить влияние экспериментального гипер- и гипотиреоза на динамику экспрессии DMRT1 в СПК в постнатальном развитии; проверить возможность использования фидера из СПК для дифференцировки сперматогониальных клеток в культуре.

1.2 Материалы и методы

1.2.1 Изучение влияния экспериментального гипер- и гипотиреоза на СПК

Для создания гипертиреоза мышам-самцам линии C57Bl/6, начиная с 1 сут после рождения, каждый день проводили подкожные инъекции тиреоидного гормона Т3 (Sigma) в дозе 100 мкг/кг веса животного. Порошок Т3 растворяли в 0,025 N растворе гидроксида

натрия и далее в физиологическом растворе. Контрольным животным инъецировали буфер, в котором растворяли ТЗ. Семенники отбирали на 6 и 9 сут после рождения от не менее, чем 3-4 животных на срок. Для создания гипотиреоза в питьевую воду мышам-самкам с мышатами, начиная с 1 сут после рождения, добавляли ингибитор синтеза тиреоидного гормона в щитовидной железе 6-Propyl-2-Thiouracil (PTU; 0.06%) и подсластитель (концентрат экстракта стевии, 5 капель на 1 л). Воду меняли каждые 3-4 сут. Семенники не менее 3-4 животных отбирали на 12 сут после рождения. В качестве контроля использовали животных, получавших обычную питьевую воду.

Семенники фиксировали в 10%-ном забуференном формалине и подвергали стандартной гистологической проводке, после чего готовили парафиновые срезы толщиной 4 мкм по стандартной методике. По 3-5 срезов от каждого образца, расположенные на равном расстоянии друг от друга и содержащие сеть семенника, окрашивали первичными антителами к SOX9 (Millipore, AB5535, 1:200), DMRT1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-377167, 1:50) и CDH1 (BD Bioscience, 560064, 1:10) и соответствующими вторичными антителами с флуоресцентной меткой (Thermo Fisher, Vector Laboratories). Образцы фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5, анализировали и проводили подсчеты с помощью программного обеспечения CellProfiler.

1.2.2 Использование фидера из СПК для дифференцировки сперматогониальных клеток в культуре

Для выделения СПК использовали 2-3 месячных самцов мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, экспрессирующих GFP под промотором гена бета-актина. Фрагменты семенников инкубировали сначала с коллагеназой IV типа (3 мг/мл, Sigma) и ДНКазой I типа (0.1 мг/мл, Sigma) в течение 15 мин при 37°C, затем с трипсином (0.125%, Thermo Fisher), также в течение 15 мин. Клетки высаживали в культуральные планшеты, покрытые Matrigel (Corning), в концентрации 2×10^5 клеток/см² и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher) с 1% фетальной бычьей сыворотки FBS, d-(+) глюкозой (6 мг/мл), комплексом витаминов для MEM, незаменимыми аминокислотами, d-биотином (10 мкг/мл), dl-молочной кислотой (0,06%), аскорбиновой кислотой (100 мкМ), путресцином (60 мкМ), прогестероном (60 нг/мл), β-эстрадиолом (30 нг/мл), 2-меркаптоэтанолом (10 мкМ, все в Sigma), пируватом натрия, инсулин/трансферрин/селенитом (ITS, Thermo Fisher), пенициллин/стрептомицином, комплексом низкомолекулярных ингибиторов Y-27632 (10 μМ, Abcam, Великобритания), A-83-01 (0,5 μМ, Sigma) и CHIR99021 (3 μМ, Sigma), сокращенно

YAC. Достигшие конfluence культуры СПК обрабатывали митомицином С (10 мкг/мл), чтобы остановить пролиферацию, и использовали как фидер для половых клеток. В качестве контроля использовали культуру соматических клеток извитых семенных канальцев, состоящую из перитубулярно-мышечных клеток и КС.

Для получения сперматогониальных клеток семенники мышат ICR обрабатывали коллагеназой в течение 15 мин, а затем трипсином в течение 10 мин. Суспензию, содержащую смесь половых и соматических клеток, культивировали в среде для стволовых сперматогониальных клеток (ССК) [9], в состав которой входили StemPro-34 (Thermo Fisher), дополнительные компоненты, такие же, как и в среде для СПК, кроме YAC, и ростовые факторы: GDNF (10 нг/мл, Sigma), FGF2 (10 нг/мл, SCI-Store), EGF1 (20 нг/мл, SCI-Store) и LIF (1 нг/мл, SCI-Store). Чтобы избавиться от соматических клеток суспензию перемещали в новый планшет через каждые 6-18 ч, добиваясь того, чтобы все соматические клетки прикрепились к пластику. Через 4 сут суспензию половых клеток либо сразу наслаивали на фидер из СПК, либо переносили на фидер из мышечных эмбриональных фибробластов (MEF), получали линию сперматогониальных стволовых клеток и только после этого переносили на фидер из СПК. Было проведено два эксперимента по культивированию половых клеток. В первом культуры половых клеток на фидере из СПК и на контрольном фидере поддерживали в течение 7 сут при 37°C на среде для ССК. Во втором через 3-4 суток культуры переносили на 34°C, на среду для дифференцировки половых клеток, со следующим составом: DMEM/F12 с GlutaMAX с пенициллин/стрептомицином, пируватом натрия, dl-молочной кислотой (0,06%), 10% KSR, RA (10^{-6} М), Активин А (100нг/мл). Культуры фиксировали через 9 сут после нанесения половых клеток.

Анализ культур проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, для которого использовали первичные антитела против DMRT1, DDX4 (Abcam, ab13840, 1:200), GFP (ThermoFisher, A10262, 1:400), STRA8 (Abcam, ab49602, 1:200), SCP3 (Abcam, ab5093, 1:200) и соответствующие вторичные антитела с флуоресцентной меткой (Thermo Fisher). Препараты фотографировали на микроскопе Leica DMI6000, анализировали и проводили подсчеты с помощью программного обеспечения CellProfiler. Для каждой культуры было проанализировано не менее 60 полей зрения (объектив $\times 10$).

1.3 Результаты и обсуждение

Тиреоидный гормон Т3 оказывает различные регуляторные воздействия на процессы роста, развития и метаболизма. В частности, он влияет на развитие семенников в постнатальный период. Как гипер-, так и гипотиреоз изменяют размер семенников,

воздействуют на пролиферацию и дифференцировку КС, клеток Лейдига и половых клеток. Гипертиреоз ускоряет развитие семенников, сдвигая дифференцировку КС на более ранний срок, в то время как гипотиреоз оказывает обратное воздействие [10]. СПК в составе сети семенника также претерпевают значительные изменения в этот период, одним из таких изменений является снижение уровня DMRT1 [8], происходящее между 11 и 12 сут постнатального развития. Чтобы выяснить, влияет ли Т3 на динамику экспрессии DMRT1 в СПК, сеть семенника была изучена с помощью иммунофлуоресцентного анализа у гипер- и гипотиреодных мышей разных возрастов.

У гипертиреодных мышей возрастом 6 сут доля DMRT1⁺ клеток сети семенника не отличалась от контроля, составляя около 35.4 ± 2.0 % (рисунок 1.1).

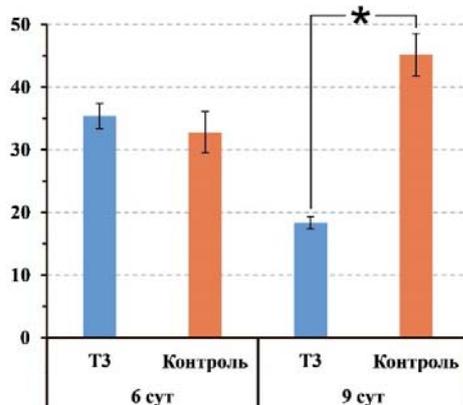


Рисунок 1.1 - Доля DMRT1⁺ клеток сети семенника у контрольных и гипертиреодных (Т3) мышей на 6 и 9 сут постнатального развития. Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. *P≤0.05, непараметрический критерий Манна-Уитни

Однако между 6 и 9 сут число DMRT1⁺ клеток в сети семенников контрольных мышей увеличивалось, в то время как у мышей с повышенным уровнем Т3, уменьшалось, так что в итоге, на 9 сут, доля DMRT1⁺ СПК у гипертиреодных мышей была более чем в два раза выше, чем в контроле (рисунок 1.1). На рисунке 1.2 представлены репрезентативные изображения срезов семенников. Клетки сети семенника идентифицируются по ко-экспрессии SOX9 и CDH1. Видна разница в числе DMRT1⁺SOX9⁺CDH1⁺ клеток между контрольными и гипертиреодными мышами.

В случае гипотиреодных мышей, на которых воздействовали ингибитором синтеза тиреоидных гормонов PTU, ситуация была обратной. Были изучены животные возрастом 12 сут, на этот срок происходит резкое снижение числа DMRT1⁺ клеток сети семенника в контроле (рисунок 1.3). В то же время видно, что у гипотиреодных мышей на этот срок уровень экспрессии DMRT1 в сети семенника продолжает оставаться высоким (рисунок 1.3). Также можно отметить, что семенник в целом в контроле более дифференцирован. Извитые

семенные каналцы имеют больший диаметр, в их просвете видны мейотические половые клетки, отсутствующие у гипотиреоидных мышей.

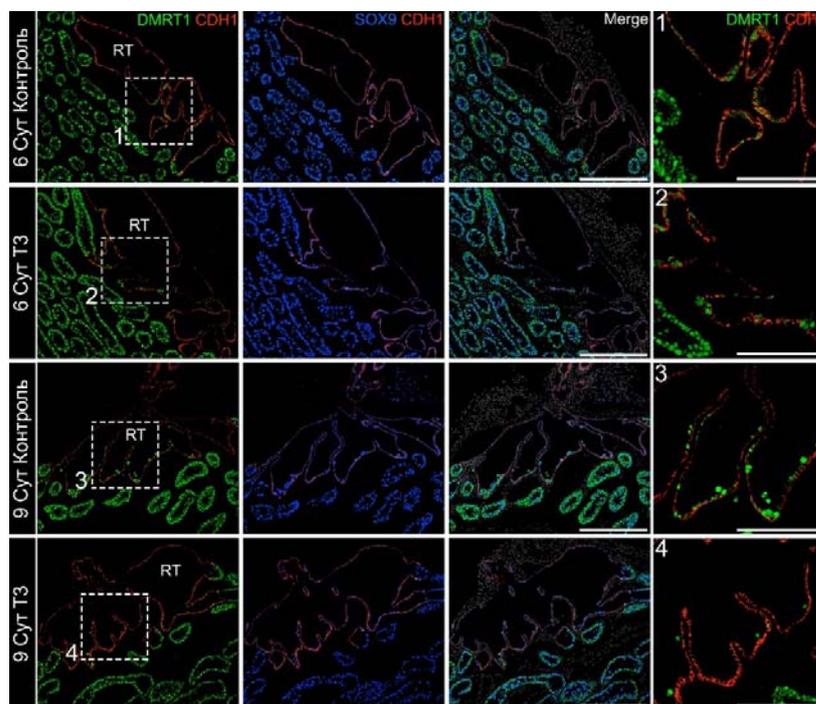


Рисунок 1.2 - Тройная иммунофлуоресцентная окраска срезов семенников 6 и 9-суточных контрольных и гипертиреоидных (Т3) мышей на DMRT1, CDH1 и SOX9. RT - сеть семенника. 1-4 - увеличенные изображения фрагментов сети семенника, очерченных пунктиром. Масштаб: 200 мкм, 100 мкм (1-4)

Таким образом, очевидно, что уровень тиреоидного гормона Т3 влияет на дифференцировку СПК в составе сети семенника в постнатальном развитии мыши. Однако остается неясным, влияет ли Т3 непосредственно на СПК, или его эффект опосредован другими клетками, например, дифференцирующимися КС, клетками Лейдига или половыми клетками, вступающими в мейоз. Все эти клетки, через различные паракринные факторы, могут воздействовать на эпителий сети семенника, вызывая изменения в экспрессии DMRT1. Также не исключено, что тестостерон, чей уровень повышается в ходе созревания семенников, может влиять на СПК эндокринно.

Для достижения второй цели работы, исследования воздействия СПК на пролиферацию и дифференцировку половых клеток в культуре, сперматогониальные клетки культивировали на фидере из СПК при различных условиях. Половые клетки идентифицировали по окраске на DDX4, РНК-хеликазу, присутствующую исключительно в половых клетках на всех этапах их дифференцировки, или по окраске на мейотические маркеры STRA8 и SCP3.

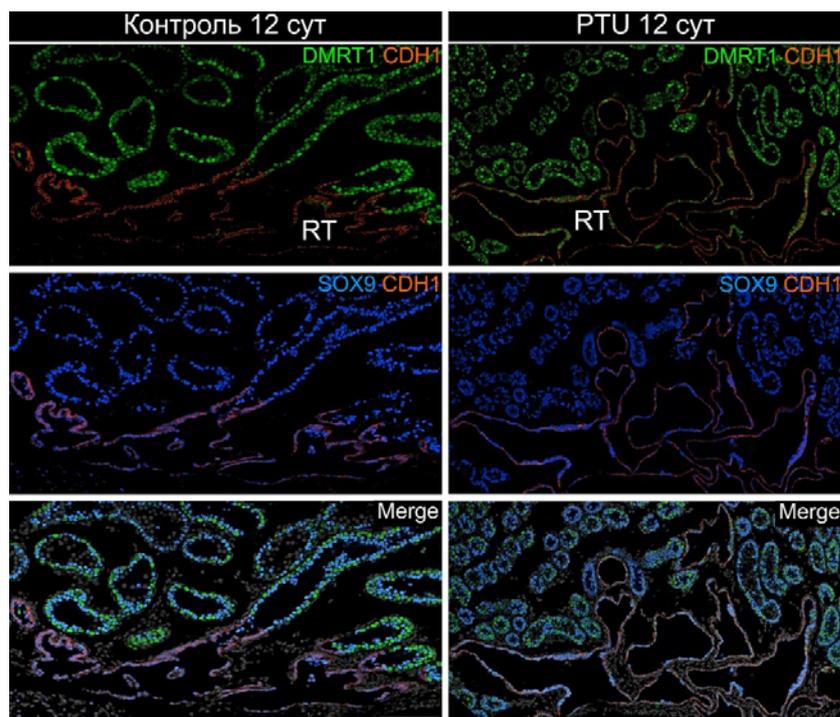


Рисунок 1.3 - Тройная иммунофлуоресцентная окраска срезов семенников 12-суточных контрольных и гипотиреоидных (PTU) мышей на DMRT1, CDH1 и SOX9. RT - сеть семенника. Масштаб: 100 мкм

Установили, что число половых клеток, поддерживавшихся на среде для ССК при 37°C, было лишь незначительно выше на фидере из СПК [11], чем на контрольном фидере (рисунок 1.4 А). Этого результата можно было ожидать, так как на среде для ССК половые клетки могут поддерживаться на фидерах разного происхождения, в том числе MEF. По-видимому, в данном случае состав среды играл большую роль, чем природа фидера. Для оценки дифференцировки половых клеток в таких условиях проводили двойную иммунофлуоресцентную окраску на DDX4 и DMRT1. DMRT1, помимо КС, экспрессируется в сперматогониях, его экспрессия снижается по мере их дифференцировки и полностью исчезает в профазе мейоза I [12]. На контрольном фидере доля DDX4⁺/DMRT1⁻ клеток, то есть сперматогониев, вступивших в дифференцировку, составляла 2.5±0.2%, на фидере из СПК их число было статистически достоверно больше, равняясь 3.6±0.5% (рисунок 1.4 Б).

Было сделано предположение, что при более подходящих условиях культивирования СПК могут способствовать дифференцировке половых клеток. Для проверки этого половые клетки культивировали на фидерах из СПК в условиях, которые по литературным данным должны способствовать вступлению в мейоз [13], а именно: при 34°C и с добавлением ретиноевой кислоты и активина А. Окраска культур на мейотические маркеры STRA8 и SCP3 показала, что мейоз индуцируется как на фидере из СПК, так и на контрольном фидере,

но в случае СПК число половых клеток было более чем в 2 раза выше (рисунок 1.4 В, Г), что свидетельствует о способности СПК эффективнее поддерживать жизнеспособность половых клеток в ходе дифференцировки.

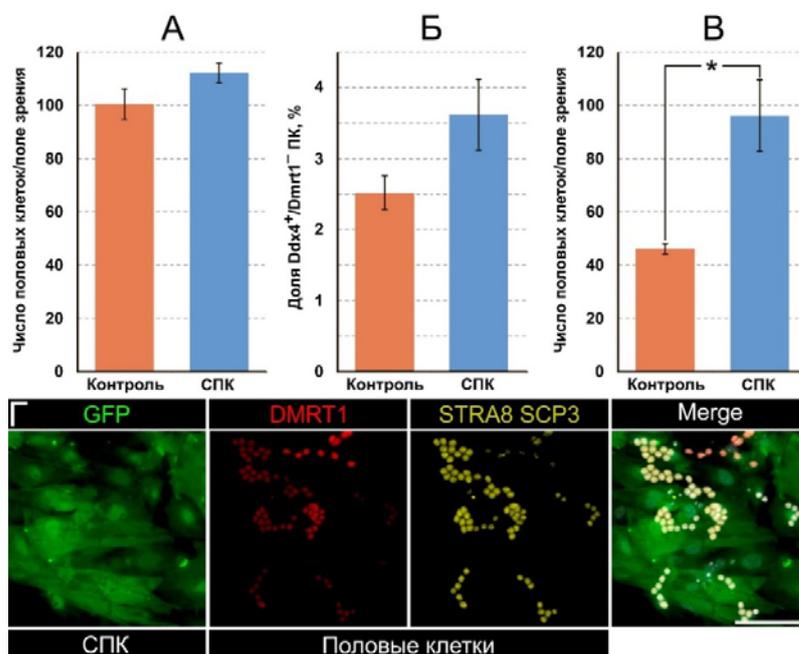


Рисунок 1.4 - Количественный анализ половых клеток на фидере из СПК и на контрольном фидере (А - В). Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. $*P \leq 0.05$, непараметрический критерий Манна-Уитни. (Г) иммунофлуоресцентная окраска культуры половых клеток на фидере из СПК на GFP (маркирует СПК), DMRT1 и STRA8 с SCP3, экспрессия DMRT1 снижена в половых клетках, ярко окрашивающихся на STRA8 с SCP3. Масштаб: 100 мкм (Г)

1.4 Заключение

Продолжено изучение популяции СПК, обнаруженной нами в ходе предыдущих исследований в сети семенника и способной к активной пролиферации в культуре. Впервые установлено, что дифференцировка популяции СПК в постнатальном развитии мыши зависит от тиреоидного гормона, искусственные изменения уровня которого сдвигают время снижения экспрессии DMRT1 в СПК, параллельно с ускорением/замедлением созревания семенника. Также исследовано воздействие СПК на дифференцировку половых клеток. Показано, что сперматогониальные клетки, помещенные на фидер из СПК, с большей эффективностью дифференцируются и вступают в мейоз, чем на контрольных фидерах.

1.5 Список использованных источников

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

- 2 Tarulli G.A., Stanton P.G., Meachem S.J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated?//Biology Reproduction. - 2012. - Vol. 87. P. 1 - 11.
- 3 Zhang Z.H., Hu Z.Y., Song X.X., Xiao L.J., Zou R.J., Han C.S., Liu Y.X. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism//Internal Journal of Andrology. - 2004. - Vol. 27. P. 234 - 239.
- 4 Tarulli G.A., Stanton P.G., Loveland K.L., Rajpert-De Meyts E., McLachlan R.I., Meachem S.J. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer//Spermatogenesis. - 2013. Vol. 3. P. e24014.
- 5 Ahmed E.A., Barten-van Rijbroek A.D., Kal H.B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S.C., van Pelt A.M., de Rooij D.G. Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells//Biology Reproduction. - 2009. - Vol. 80. P. 1084 - 1091.
- 6 Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture//Reproduction. - 2016. - Vol. 152, № 4. P. 271 - 281.
- 7 Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Проллиферативная активность клеток Сертоли извитых семенных канальцев мыши//Цитология. - 2018. - Т. 60, № 4. С. 308 - 315.
- 8 Malolina E.A., Kulibin A.Yu. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1//Reproduction. - 2019. - Vol. 158. P. 399 - 413.
- 9 Falciatori I., Lillard-Wetherell K., Wu.Z., Hamra F.K., Garbers D.L. Deriving mouse spermatogonial stem cell lines//Methods Mol. Biol. - 2008. - Vol. 450. P. 181 - 192.
- 10 Hernandez A. Thyroid Hormone Role and Economy in the Developing Testis//Vitam Horm. - 2018. - Vol. 106. P. 473 - 500.
- 11 Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Создание модели сокультивирования Сертоли-подобных клеток мыши со сперматогониальными клетками//Клеточные технологии. - 2019. - № 2. С. 133 - 138.
- 12 Zarkower D. DMRT genes in vertebrate gametogenesis//Curr Top Dev Biol. - 2013. - Vol. 102. P. 327 - 356.
- 13 Zhou Q., Wang M., Yuan Y., Wang X., Fu R., Wan H., Xie M., Liu M., Guo X., Zheng Y., Feng G., Shi Q., Zhao X.Y., Sha J., Zhou Q. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells *in vitro*//Cell Stem Cell. - 2016. - Vol. 18, № 3. P. 330 - 340.

РАЗДЕЛ 2. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

2.1 Введение

Моноаминергические транмиттеры являются универсальными сигнальными молекулами, контролирующими процессы развития [1, 2]. Среди них выделяется серотонин, как транмиттер, обладающий наибольшим числом описанных функций вне нервной системы - как в эмбриональном развитии, так и во взрослых организмах. Одной из универсальных в животном мире функций серотонина является регуляция женской репродуктивной функции на всех ее этапах. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса [3], в фолликулярной жидкости [4]. На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток. Известно, что основным источником катехоламинов в яичнике являются терминали иннервирующих его вегетативных ганглиев [5], тогда как источником серотонина предполагается, прежде всего, кровь, а также, на основании экспрессии триптофангидроксилазы, синтез в самом яичнике [6]. Однако, полученные нами ранее данные об экспрессии основных компонентов серотонинергической системы в клетках яичника [7] ставят под сомнение наличие локального синтеза серотонина в компонентах овариальных фолликулов. Для выяснения источников серотонина в ткани яичника млекопитающих, проведено исследование экспрессии и функциональной активности ферментов синтеза серотонина, прежде всего декарбоксилазы ароматических аминокислот DDC, и мембранного транспортера серотонина SERT, ответственного за захват серотонина из межклеточной среды.

Выбор референсного гена является важной и непростой задачей, решение которой необходимо для проведения дальнейшего адекватного анализа уровней экспрессии целевых генов. Количественная ПЦР в реальном времени является стандартным методом анализа экспрессии генов. Тем не менее, аккуратное исследование экспрессии генов требует тщательного отбора референсных генов для нормализации [8, 9]. Несмотря на большое количество исследований в области выбора эталонных генов, существуют доказательства того, что экспрессия генов, обычно используемых в качестве надежных внутренних контролей, часто зависит от конкретных экспериментальных условий и образцов [10, 11]. Определение уровней экспрессии генов может быть важным для количественной оценки качества ооцитов, что делает возможным оценку применяемого протокола вспомогательных репродуктивных технологий, таких как созревание ооцитов или овариальных фолликулов в

культуре *in vitro*. В отчетный период проанализирована стабильность экспрессии семи наиболее часто используемых эталонных генов (*Actb*, *Eef1e1*, *Gapdh*, *H2afz*, *Ppia*, *Rpl4* и *Ubc*) в ооцитах мыши на стадии GV.

2.2 Материал и методы

В качестве экспериментальной модели в исследовании использовали яичники 14-дневных самок, в которых происходит первая волна активного фолликулогенеза. В этот период происходит всплеск синтеза эстрогенов и вступление большого количества овариальных фолликулов в фазу фолликулярного роста, потенциально способного произвести в условиях *in vitro* полноценные зрелые яйцеклетки [12]. Яичники мыши выделяли и препарировали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) под контролем стереомикроскопа.

Для молекулярно-генетического анализа экспрессии генов из яичников выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Концентрацию общей РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США) с контролем качества по A260/280. После обработки ДНКазой I (Fermentas, США) 1 мкг РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). Количественный анализ экспрессии генов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием системы StepOnePlus (AppliedBioSystems, США) и набора qPCRmix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия).

Для исследования стабильности экспрессии референсных генов использовали ооциты, полученные от двух групп животных. Первая группа содержала ооциты, полученные от незрелых мышей (возраст 21-24 дня). Ооциты из второй группы были получены от взрослых мышей (3 месяца) на стадии проэструса эстрального цикла. Стадии эстрального цикла оценивали по вагинальным мазкам, как описано [13]. Яичники помещали в среду, содержащую HEPES в качестве pH-буфера. Затем ооциты механически выделяли из яичников с помощью инсулиновых игл, собирали и измеряли. Использовали только ооциты без прикрепленных кумулюсных клеток. Ооциты были разделены на группы, по 10 ооцитов в каждой группе для дальнейшего анализа с помощью qRT-PCR. Для анализа было получено 8 образцов (каждый образец содержал 10 ооцитов) из каждой группы. Анализ полученных первичных данных с использованием трех распространенных алгоритмов и соответствующих программ: geNormv.3.5 [14], Bestkeeper [15] и NormFinder [16]. Статистическую значимость различий диаметров ооцитов между образцами из разных групп рассчитывали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использовался

критерий нормальности Колмогорова-Смирнова и Лилифорса. Тест на нормальность по Колмогорову-Смирнову и Лилифорсу и U-тест Манна-Уитни были выполнены с использованием программного обеспечения Statistica 7.0 (Dell, Inc., США). Различия считались статистически значимыми, если $p < 0,05$.

В экспериментах по исследованию функциональной активности систем синтеза и захвата серотонина изолированные яичники разрезали на 8 фрагментов, делили на экспериментальные группы ($N = 10$) и инкубировали в среде DMEM/F-12 с добавлением глутамина (3 мМ) и тестируемых веществ в течение 2 ч при 37°C и концентрации CO₂ 5%. В эксперименте к фолликулам добавляли 5-гидрокситриптофан (НТР, в конечной концентрации 10мМ, Sigma-Aldrich), серотонин (5НТ, 1мМ, Sigma-Aldrich), флуоксетин (FLU, 10 мМ, Sigma-Aldrich). Флуоксетин добавляли за 15 мин до серотонина.

Для иммуногистохимического исследования яичники фиксировали в 4% параформальдегиде (рН 7.5), после чего приготавливали криосрезы толщиной 20 мкм и окрашивали антителами. В работе использовали первичные кроличьи антитела против серотонина (Sigma Aldrich S5545), против декарбоксилазы ароматических аминокислот DDC (HRA017742 Sigma) и против транспортера серотонина SERT (ab174770 Abcam) и вторичные ослиные антитела против Ig кролика, конъюгированные с флуорофором Alexa Fluor 568 (Abcam ab175694). Препараты просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5 (ЦКП ИБР РАН) и регистрировали иммунофлуоресценцию при постоянных параметрах интенсивности лазера и чувствительности детектора. Уровень иммунофлуоресценции на полученных изображениях измеряли в программе ImageJ и статистически обрабатывали в программе GraphPad Prism. Эксперимент проведен в пяти повторностях.

2.3 Результаты и обсуждение

В отчетный период проведено исследование экспрессии и функциональной активности транспортера серотонина SERT, а также фермента синтеза серотонина декарбоксилазы ароматических аминокислот DDC в яичнике мыши, в том числе в овариальных фолликулах на разных стадиях фолликулогенеза. Результаты опубликованы в специальном выпуске "Serotonin in Health and Disease" журнала International Journal of Molecular Sciences [17].

В постнатальном периоде у самок мышей происходит постепенная активация роста фолликулов яичника, и в яичнике постоянно появляются все более прогрессивные стадии фолликулогенеза. Проведено количественное исследование экспрессии генов компонентов, предположительно ответственных за синтез и поглощение серотонина в яичниках

постнатальных мышей, чтобы определить динамику их экспрессии и сделать выводы о периоде фолликулогенеза, в течение которого эти механизмы могут быть активными (рисунок 2.1). Выявлено, что динамика экспрессии гена SERT демонстрирует выраженный пик в возрасте 14 дней после рождения (dpp), когда в яичнике преобладают растущие фолликулы, и значительно более низкий уровень экспрессии на ранних и более поздних стадиях развития. В то же время экспрессия гена DDC максимальна в яичниках новорожденных мышей, когда подавляющее большинство фолликулов находится в примордиальной стадии, и незначительно уменьшается на поздних стадиях. Уровни экспрессии генов TPH1 и TPH2 также имеют максимум в яичниках новорожденных мышей и затем снижаются. На основании полученных результатов можно полагать, что транспорт серотонина максимально активен в период роста фолликулов. В то же время активность системы синтеза, скорее всего, ограничивается более ранними стадиями оогенеза.

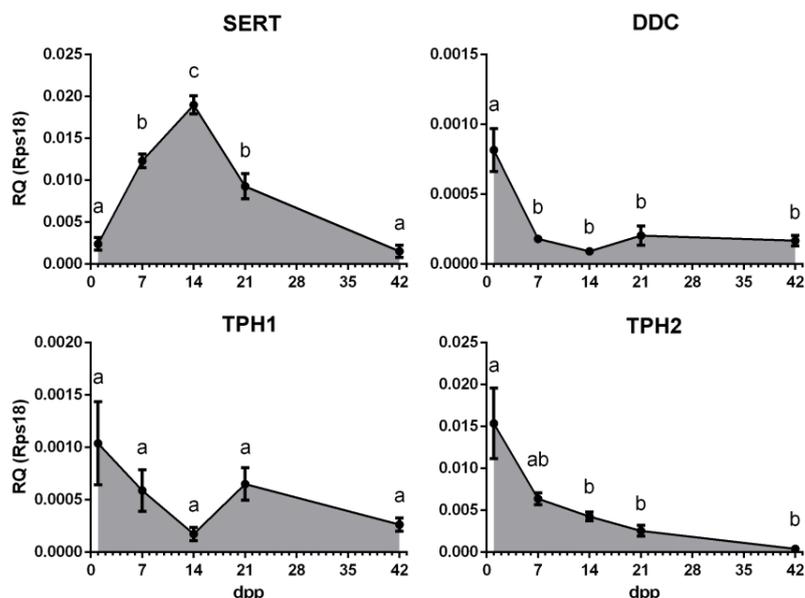


Рисунок 2.1 - Профили экспрессии генов серотонинового транспортера SERT и ферментов синтеза серотонина DDC, TPH1 и TPH2 в постнатальном развитии яичника мыши. Относительную экспрессию (RQ) рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ относительно контрольного гена RPS18 ($M \pm SEM$). Разные буквы обозначают наличие статистически значимые различия между группами при $p < 0,05$ в соответствии с односторонним критерием ANOVA с тестом множественных сравнений Холма-Сидака. dpp - дни после рождения

Для установления локализации транспортера серотонина SERT и декарбоксилазы DDC в яичнике мыши проведено иммуногистохимическое исследование с применением специфических антител против SERT и DDC.

Иммунореактивность против SERT обнаруживается во всех клеточных компартментах яичника, включая овариальные фолликулы, как в ооцитах, так и в фолликулярных клетках

(рисунок 2.2). Тем не менее, в то время как интенсивность иммуноокрашивания в примордиальных фолликулах низкая, она становится заметно более выраженной в первичных однослойных фолликулах (рисунок 2.2 Б). Наиболее интенсивное иммуноокрашивание наблюдается в ооцитах пре-антральных и антральных фолликулов (рисунок 2.2 В, Г). Иммуноокрашивание SERT наблюдается по всей цитоплазме, но гораздо менее интенсивно в области ядра. В областях наибольшей интенсивности иммуноокрашивание приобретает зернистую структуру. Мы выполнили количественный анализ интенсивности иммунофлуоресценции в отдельных клеточных компартаментах яичника. SERT иммунореактивность в клетках гранулезы примордиальных фолликулов, а также в клетках гранулезы и теки растущих фолликулов находится на одинаково низком уровне. Иммунофлуоресценция в ооцитах растущих фолликулов намного выше (примерно в 2,3 раза), а в ооцитах примордиальных фолликулов находится на промежуточном уровне. Важно, что различия между группами ооцитов являются статистически значимыми.

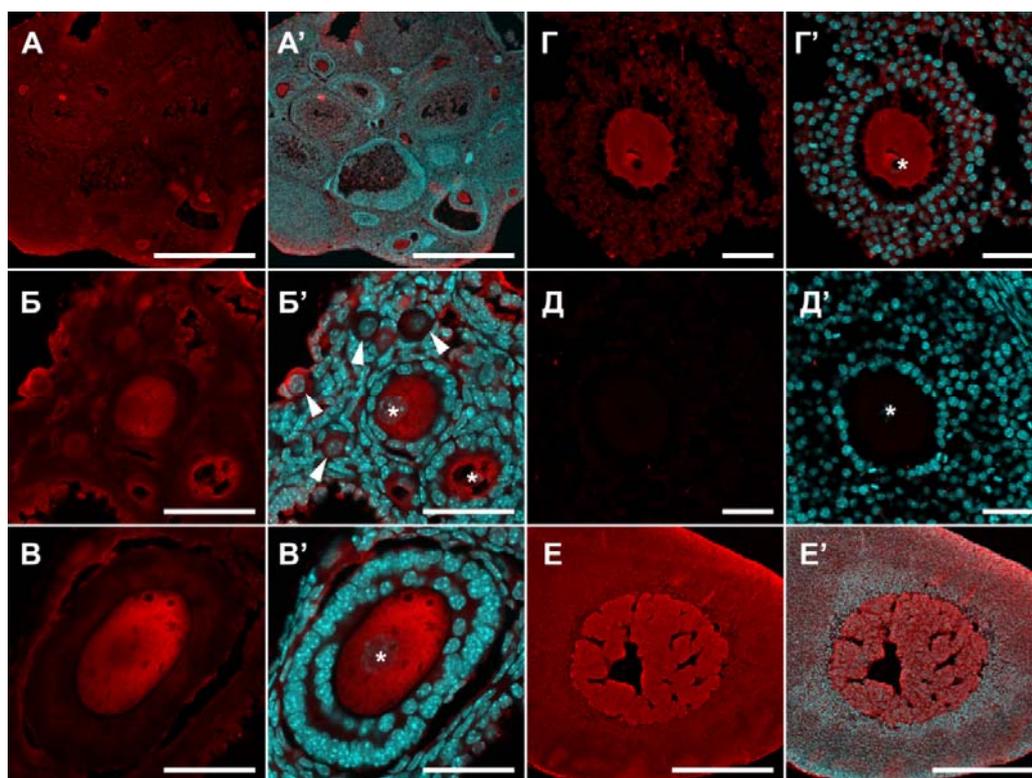


Рисунок 2.2 - Иммуногистохимическое выявление SERT в яичнике мыши. (А - Г) Иммунореактивность против SERT в яичнике препубертатных (Б, В) и взрослых мышей (А, Г). (Д) Отрицательный контроль: иммуноокрашивание яичника без первичных антител. (Е) Положительный контроль: надпочечник с иммунореактивностью против SERT в области медулы. (А' - Е') Изображения с совместным окрашиванием ядер. Криосрезы размером 20 мкм окрашивали на SERT (красный псевдоцвет), а ядра окрашивали DAPI (голубой псевдоцвет). Стрелки указывают на примордиальные фолликулы. Звездочками отмечены ооциты в растущих фолликулах. Масштабный отрезок: (А, Е) 500 мкм; (Б - Д) 50 мкм

Иммуногистохимическое исследование локализации DDC показало, что в клетках гранулезы, клетках теки и строме яичника наблюдается небольшой фоновый уровень иммуноокрашивания. Иммунореактивность DDC обнаруживается в ткани стромы в волокнах адренергических нейронов, иннервирующих яичник (рисунок 2.3 Г), а также в тучных клетках,. Кроме того, интенсивное иммуноокрашивание обнаруживается в ооцитах примордиальных фолликулов (рисунок 2.3 А, Б). На более поздних стадиях фолликулогенеза, начиная с первичных однослойных фолликулов, интенсивность иммуноокрашивания постепенно снижается до исходного уровня (рисунок 2.3 Б, В). Иммуноокрашивание декарбоксилазы в ооцитах имеет тонкую, зернистую структуру и обнаруживается во всей цитоплазме, но не распространяется на область ядра. Мы провели количественный анализ DDC иммунореактивности в клеточных компартментах яичников. DDC иммунореактивность низкая в клетках гранулезы примордиальных фолликулов и в клетках гранулезы и тека растущих фолликулов. Иммунофлуоресценция в ооцитах примордиальных фолликулов примерно в 2,6 раза выше. Иммунореактивность DDC в ооцитах растущих фолликулов находится на промежуточном уровне. Различия между различными группами ооцитов являются статистически значимыми.

При окрашивании яичников 14-дневных и взрослых мышей были получены согласующиеся результаты. Это говорит о том, что динамика, наблюдаемая на рисунок 2.1, в первую очередь связана с изменениями морфологии и доли фолликулов и стромальных структур в яичнике. Отрицательные контрольные окрашивания без первых антител показаны на рисунках 2.2 Е и 2.3 Е. В качестве положительного контроля проведено иммуноокрашивание надпочечников, и как SERT, так и DDC выявляются в мозговом веществе надпочечников (рисунок 2.2 F и 2.3 F).

Проведены эксперименты по кратковременной инкубации фрагментов яичника с модуляторами концентрации серотонина для определения активности систем синтеза и захвата серотонина. Для исследования был выбран возраст 14 дней, поскольку в это время в яичнике мыши обнаруживается большое количество как растущих, так и примордиальных фолликулов (см. рисунок 2.3 А). Более того, снижение уровня экспрессии обоих генов наблюдается на более поздних стадиях развития яичника.

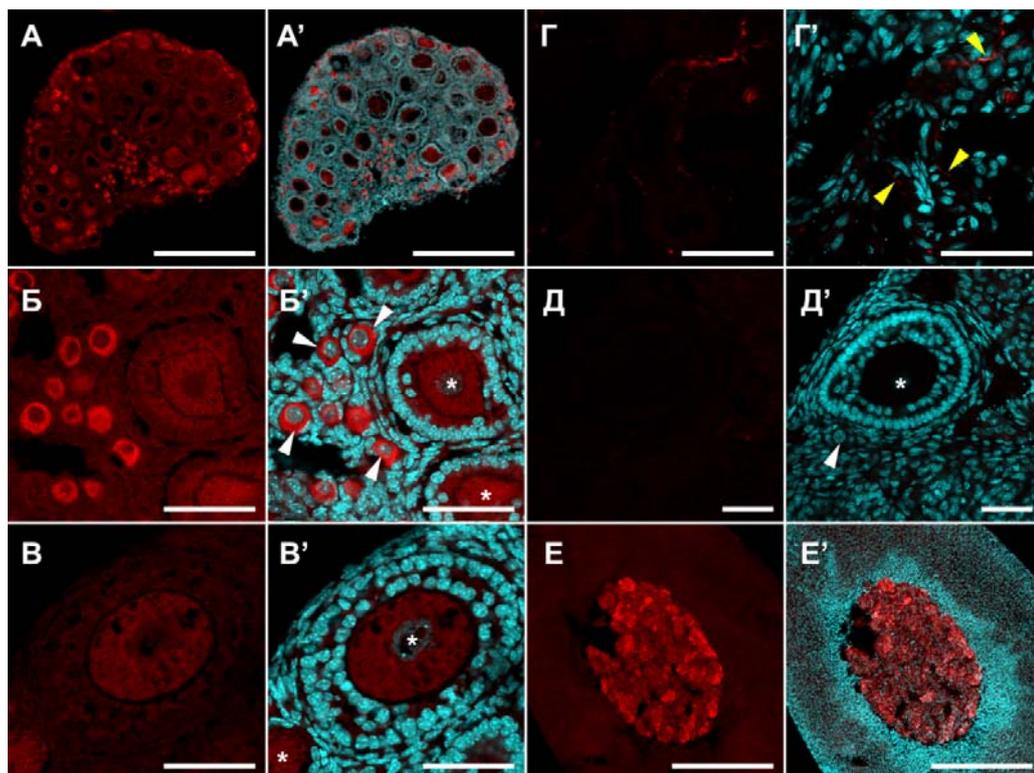


Рисунок 2.3 - Иммуногистохимическое выявление DDC в яичнике мыши. (А - Г) DDC иммунореактивность в яичнике препубертатных (А, Б, Г) и взрослых мышей (В). (Д) Отрицательный контроль: иммуноокрашивание яичника без первичных антител. (Е) Положительный контроль: надпочечник с DDC иммунореактивностью в медуллярной области. (А' - Е') Изображения с совместным окрашиванием ядер. Криосрезы диаметром 20 мкм окрашивали на DDC (красный псевдоцвет), а ядра окрашивали DAPI (голубой псевдоцвет). Белые стрелки указывают на примордиальные фолликулы. Звездочками отмечены ооциты в растущих фолликулах. Желтые стрелки указывают на нервные волокна в стромальной ткани яичника. Масштабный отрезок: (А, Е) 500 мкм; (Б - Д) 50 мкм

Увеличение интенсивности иммунофлуоресценции 5HT наблюдалось в фрагментах яичника, инкубированных в 1 мкМ серотонина в течение 2 часов. Этот эффект наиболее выражен в крупных ооцитах растущих яичниковых фолликулов. Мы провели количественный расчет накопления серотонина для различных клеточных компартментов развивающегося фолликула яичника. В примордиальных фолликулах увеличение уровней иммунофлуоресценции наблюдается в ооцитах (рисунок 2.4 А) и фолликулярных клетках (рисунок 2.4 Б). Отличия от контроля в обоих случаях статистически значимы. В растущих фолликулах яичников увеличение уровня 5HT-иммунофлуоресценции происходит в ооцитах (рисунок 2.4 В, Е, 3), а также в клетках гранулезы и теки (рисунок 2.4 Г, Д). В случае ооцитов различия статистически значимы. Таким образом, функциональная активность захвата серотонина обнаруживается в ооцитах растущих фолликулов и, в меньшей степени, в примордиальных фолликулах.

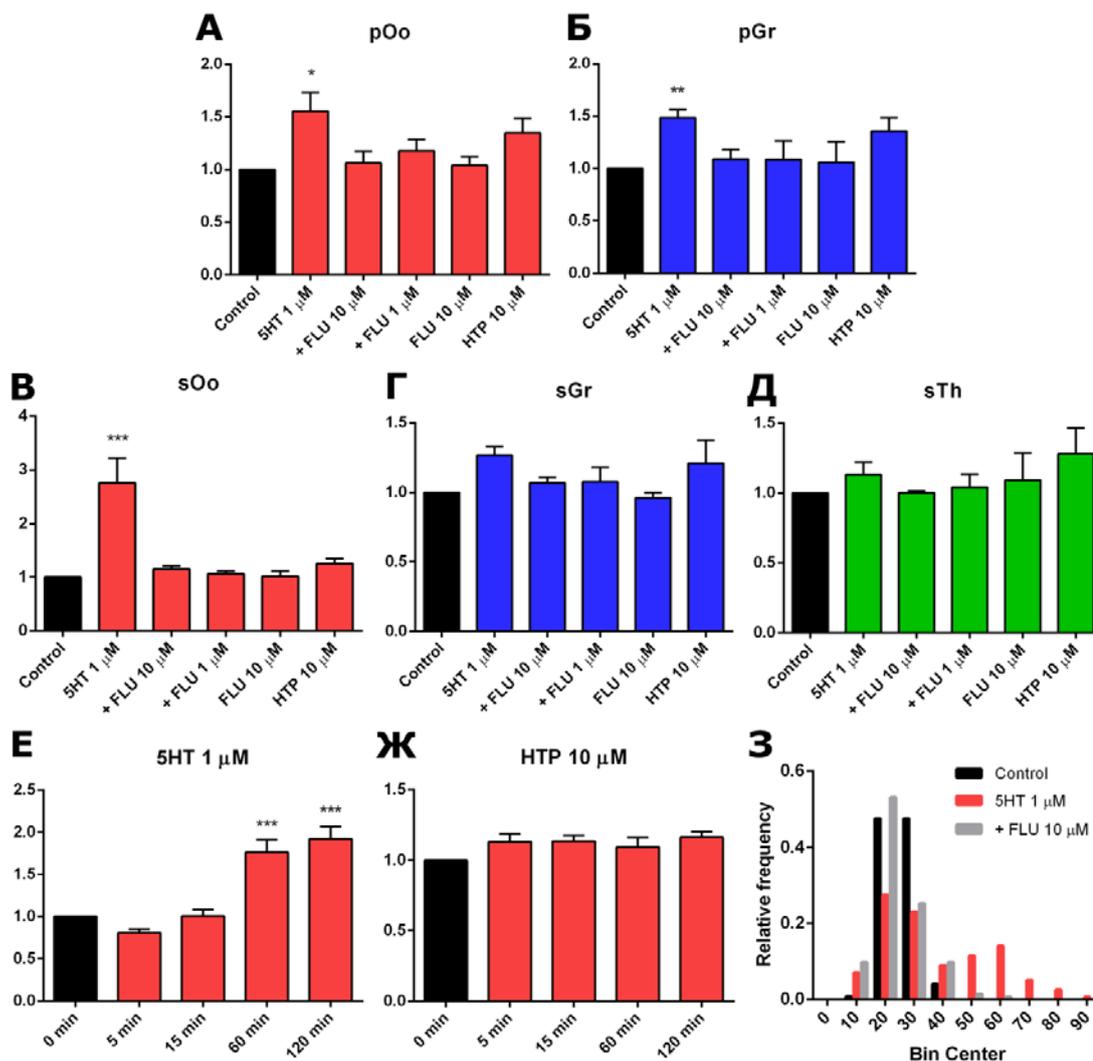


Рисунок 2.4 - Количественный анализ накопления серотонина при исследовании функциональной активности систем его синтеза и захвата в яичниках мыши. (А - Д) Количественный анализ иммунореактивности против 5HT в клеточных компартаментах яичников мыши после инкубации с серотонином (5HT), с 5HT и предшествующим добавлением флуоксетина (+ FLU), только с флуоксетином (FLU) и с 5-гидрокситриптофаном (НТР): sOo - ооциты, sGr - гранулеза и sTh - тека вторичных (преантральных) фолликулов; pOo - ооциты и pGr - гранулеза примордиальных фолликулов ($M \pm SEM$). Уровень иммунофлуоресценции в контрольном образце принят равным 1. * Обозначает статистическую значимость при $p < 0,05$, ** при $p < 0,01$ и *** при $p < 0,005$ между контрольной и опытной группами с использованием теста Фридмана. (Е, Ж) Временная динамика накопления серотонина в ооцитах растущих фолликулов (sOo) во время инкубации с 5HT (1 мкМ) и НТР (10 мкМ) ($M \pm SEM$). *** Обозначает статистическую значимость при $p < 0,005$ между контрольной и обработанной группами с использованием критерия Фридмана. (З) Гистограмма распределения частот интенсивности накопления серотонина в ооцитах растущих фолликулов (sOo). В группе 5HT наблюдается бимодальное распределение

Аналогичные эксперименты проведены с предварительным добавлением селективного ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, чтобы показать специфичность эффектов. Добавление флуоксетина (10 мкМ и 1 мкМ) к фрагментам яичника приводило к

отсутствию значительного накопления серотонина (рисунок 2.4 А - Д, З). Добавление одного флуоксетина не влияет на содержание серотонина в яичнике (рисунок 2.4 А - Д). Эти результаты позволяют предположить, что захват серотонина, наблюдаемое в яичнике, является специфическим и осуществляется транспортером SERT.

Мы исследовали активность системы синтеза серотонина в яичнике. Добавление биохимического предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (10 мкМ) к фрагментам яичников приводит к незначительному увеличению уровней иммуофлюоресценции (рисунок 2.4 А - Д), но эффект не является статистически значимым. Хотя DDC экспрессируется в яичнике, в течение периода исследования он находился в неактивном состоянии.

Было проведено исследование временной динамики накопления серотонина в ооцитах вторичных фолликулов яичника после добавления серотонина и 5-гидрокситриптофана. Было установлено, что значительные различия в содержании серотонина появляются через 1 ч после начала инкубации с серотонином (рисунок 2.4 Е), тогда как накопление серотонина с добавлением 5-гидрокситриптофана (10 мкМ, 2 ч) не происходит (рисунок 2.4 Ж).

При исследовании стабильно экспрессирующихся в ооцитах мыши референсных генов утилита GeNorm оценила *Gapdh* и *Rpl4* как наиболее стабильные гены (значение $M = 1,238$ и $1,259$ соответственно), за которыми следуют *H2afz* (значение $M = 1,533$) и *Ppia* (значение $M = 1,539$). Остальные гены были ранжированы от наиболее к наименее стабильным следующим образом: *Actb* > *Ubc* > *Eef1e1*. Программный инструмент BestKeeper классифицировал *Rpl4* и *Ppia* как наиболее стабильные эталонные гены. Остальные гены были ранжированы от наиболее к наименее стабильным следующим образом: *Gapdh* > *H2afz* > *Eef1e1* > *Ubc* > *Actb*. Приложение NormFinder определило *Gapdh* и *H2afz* как наиболее стабильную пару генов, за которыми следуют *Rpl4* и *Eef1e1*. Остальные гены были ранжированы от наиболее к наименее стабильным следующим образом: *Actb* > *Ppia* > *Ubc*. Принимая во внимание результаты, полученные во всех этих программах, *Gapdh*, *Rpl4* и *H2Afz* представляются наиболее подходящими референсными генами для количественного определения относительной экспрессии генов в GV-ооцитах мыши. Результаты опубликованы в журнале *Zygote* [18].

2.4 Заключение

Таким образом, в рамках исследования экспрессии и функциональной активности транспортера серотонина SERT и декарбоксилазы DDC в яичнике мыши выявлено, что пик экспрессии гена SERT приходится на возраст 14 дней, когда в яичнике преобладают

растущие овариальные фолликулы. В то же время все ферменты синтеза серотонина экспрессируются на максимальном уровне в яичнике новорожденных мышей, в которых преобладают примордиальные фолликулы. Получены данные, свидетельствующие в пользу смены источников серотонина в ооците при переходе от примордиальных фолликулов к стадии роста. Если компоненты, ответственные за синтез серотонина более выражено экспрессируются в примордиальных фолликулах, то специфический мембранный транспортер в большей степени экспрессируется в ооцитах во время роста фолликула. Выявлено, что синтез серотонина во всех клеточных компартментах находится на очень низком уровне активности, тогда как захват серотонина выражено присутствует и приводит к достоверному увеличению содержания серотонина в ооцитах растущих первичных и вторичных фолликулов, а также в меньшей степени в ооцитах и фолликулярных клетках примордиальных фолликулов. Достоверные различия в содержании серотонина появляются через час после начала инкубации с серотонином. Установлено, что SERT выявляется в культивируемых клетках гранулы, причем локализуется он в цитоплазме в виде мелкозернистых включений, тогда как область ядра свободна от иммунофлуоресценции. В культуре клеток гранулы не происходит статистически значимого накопления серотонина, что говорит об отсутствии выраженной активности захвата серотонина. В результате выполненного исследования получены данные о наличии экспрессии SERT в клетках гранулы как на уровне мРНК, так и на уровне белка, однако, по всей видимости, транспортер находится в функционально неактивном состоянии. При исследовании стабильно экспрессирующихся в GV-ооцитах мыши референсных генов выявлено, что наиболее подходящими референсными генами для нормализации при количественном определении относительной экспрессии генов в GV-ооцитах мыши методом ПЦР в реальном времени являются *Gapdh*, *Rpl4* и *H2Afz*.

2.5 Список использованных источников

- 1 Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. - М.: Наука, 1967.
- 2 Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы//Онтогенез. - 2007. - Vol. 38, № 4. P. 262 - 270.
- 3 Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos//Biology of Reproduction. - 2005. - Vol. 73, № 2. P. 358 - 365.

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

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

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

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

8 Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR//J. Appl. Genet. - 2013. - Vol. 54. P. 391 - 406.

9 Chapman J.R., Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies//PLoS One - 2015. - № 10. P. e0141853.

10 Zhong H., Simons J.W. Direct comparison of GAPDH, b-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia//Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1999. - № 259. P. 523 - 526.

11 Selvey S., Thompson E.W., Matthaei K., Lea R.A., Irving M.G., Griffiths L.R. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR//Mol. Cell. Probes. - 2001. - Vol. 15. P. 307 - 311.

12 Morohaku K., Tanimoto R., Sasaki K., Kawahara-Miki R., Kono T., Hayashi K., Hirao Y., Obata Y. Complete *in vitro* generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells//Proc. Natl. Acad. Sci. - 2016. - № 113. P. 9021 - 9026.

13 Zenclussen M.L., Casalis P.A., Jensen F., Woidacki K., Zenclussen A.C. Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus//Front. Endocrinol. - 2014 - Vol. 13. P. 32.

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

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

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

17 Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Y.B. Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary//International Journal of Molecular Sciences. - 2019. - Vol. 20, № 12. P. E3070.

18 Filatov M.A., Nikishin D.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. Reference genes selection for real-time quantitative PCR analysis in mouse germinal vesicle oocytes//Zygote. - 2019. - Vol. 27, № 6. P. 392 - 397.

РАЗДЕЛ 3. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА В РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ

3.1 Введение

За отчетный период работу проводили по нескольким направлениям.

3.1.1 Изучение регуляции развития, морфогенезов нормального развития и эволюции планов строения кишечнополостных

Дифференцировка осей тела и предразметка плана строения многоклеточных животных (Metazoa) относится к наиболее фундаментальным процессам развития. Среди Metazoa выделяют две группы, различающиеся количеством плоскостей симметрии и осей тела: билатерально симметричные (они имеют две основные оси тела) и радиально симметричные (имеют лишь одну, орально-аборальную ось тела). Это подразделение довольно условно: у представителей “радиально симметричных” идеальная радиальная симметрия встречается не так уж часто, и у многих из них имеется более чем одна ось тела. Вопрос о том, как в ходе эволюции появились оси тела, как возникли и эволюционировали морфогенетические процессы, вовлеченные в предразметку плана строения, имеет огромное значение для понимания происхождения и ранней эволюции царства животных. Особенно интересными в этом плане являются Metazoa, имеющие только одну ось тела, например, Cnidaria. Тип Cnidaria занимает сестринское филогенетическое положение по отношению к группе Bilateria, что делает его представителей очень ценными объектами для исследований в области эволюционной биологии развития [2]. Примечательной особенностью колониальных Cnidaria является непрерывный рост и морфогенез на протяжении всей жизни колонии, что делает их удобными моделями для изучения механизмов индивидуального развития и эволюции плана строения.

Колониальные гидроиды (Hydrozoa, Cnidaria) демонстрируют широкое разнообразие морфологии колоний, отражающее разнообразие их жизненных циклов, адаптаций к среде обитания и траекторий развития [3]. Колонии некоторых гидроидов состоят из столонов, распространяющихся по субстрату, и гидрантов (питающихся зооидов), отпочковывающихся от столонов. Этот тип колонии называется столониальным (a1 на рисунке 3.1 А). Однако представители отряда Leptothecata, колонии которых целиком покрыты хитиновым экзоскелетом, образуют колонии высокой архитектурной сложности. Несмотря на то, что каждый отдельный зооид представителей Leptothecata имеет очень простое строение и радиальную симметрию, на уровне целой колонии мы обнаруживаем различные уровни сложности организации и типы симметрии. Сложные колонии Leptothecata образуют

вертикальные побеги, состоящие из повторяющихся междуузлий, на которых расположены зооиды. Колонии растут за счет морфогенетической активности специализированных органов - верхушек роста (ВР). В ВР, расположенных на кончиках побегов, происходят циклы морфогенетических процессов, приводящих к образованию новых междуузлий, которые и формируют архитектуру колонии (a2 и a3 на рисунке 3.1 А) [4, 5].

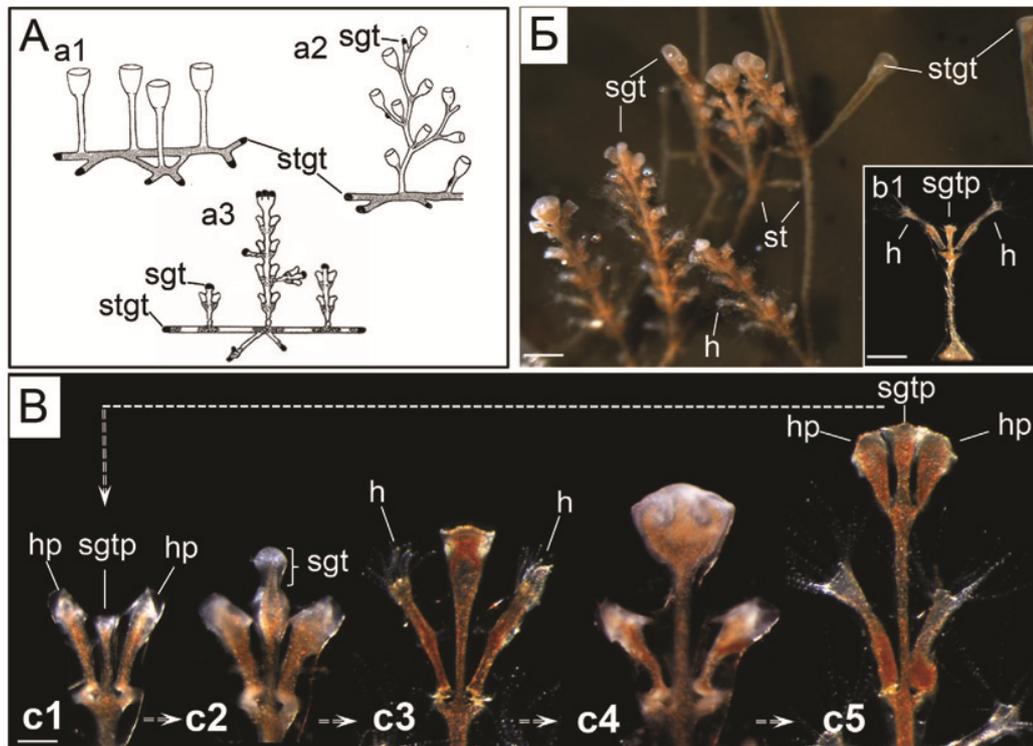


Рисунок 3.1 - Морфогенез и дифференциация ВР побега в колонии *Dynamena*. (А) Типы колоний гидроидов (по [21], с изменениями): (a1) столонияльная колония; (a2 - a3) побеги колоний с многочисленными гидрантами: (a2) колонии с симподиальным ростом; (a3) колония с моноподиальным ростом и ВР концевых побегов. (Б) колония *Dynamena*; (b1) первичный побег колонии. (В) Последовательные стадии морфогенеза ВР *Dynamena*. Стрелки указывают на последовательность этапов развития (c1 - c5). sgt - ВР побега, stgs - ВР столлона, h - гидрант, hp - зачатки гидрантов

Большинство исследований в области Evo-Devo, объектами которых являются представители типа Cnidaria, сфокусировано на изучении молекулярных механизмах разметки плана строения у неколониальных животных, таких как актиния *Nematostella* и гидроид *Hydra*, или же у гидроида *Hydractinia*, который образует просто устроенные столонияльные колонии [6, 7, 8]. В то же время, молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования архитектурно сложных колоний *Leptothecata*, остаются неисследованными. Какие молекулярные механизмы регулируют устойчивое образование сложной структуры колонии? Значительная часть данных, полученных в последнее время, подтверждает идею о том, что диверсификация планов строения Metazoa была связана, по крайней мере, частично,

с коопцией уже существующих эволюционно консервативных механизмов развития [9, 10]. Однако какая-либо информация о роли консервативных механизмов развития в эволюции колониальных кишечнополостных отсутствует. Для того чтобы восполнить этот пробел, мы провели оригинальные экспериментальные исследования [1]. В нашей работе мы сосредоточились на изучении канонического сигнального Wnt (сWnt), который участвует в спецификации и формировании осевой организации Metazoa от губок до млекопитающих [11]. Целью проведенных исследований было показать участие сWnt в пространственной разметке архитектурно сложной колонии гидроида *Dynamena pumila* (рисунок 3.1 Б) и охарактеризовать его роль в эволюционной диверсификации планов строения колониальных гидроидов [1].

3.1.2 Изучение регенерационных процессов и ранних этапов их эволюции

В 2019 году выполнялись исследования клеточных механизмов регенерации у представителей типа Porifera.

В настоящее время наблюдается большой интерес к различным аспектам происхождения и ранних этапов эволюции регенерации Metazoa: эволюции регенерационных морфогенезов, изменении роли в регенерации клеточной пролиферации, гибели и трансдифференцировки. Несмотря на этот интерес, проведено удивительно малое количество исследований, касающихся ультраструктурных, морфогенетических, клеточных и молекулярно - генетических аспектов репаративной регенерации представителей типа Porifera.

Тип Porifera состоит из четырех классов: синцитиальные губки Hexactinellida, клеточные губки Calcarea, Homoscleromorpha и Demospongiae. Последний класс самый большой и включает около 80% современных губок. Исследования регенерации губок начались на представителях демоспонгий [13, 14]. Однако существует только несколько работ, касающихся ультраструктурного описания морфогенеза и поведения клеток при репаративной регенерации губок, а регенерация стенки тела описана только у семи видов. В то же время, наши собственные детальные исследования, выполненные на разных видах Porifera с помощью ТЭМ, СЭМ, эпифлуоресцентной и световой микроскопии, иммуноцитохимии и видеосъемки, демонстрируют большое разнообразие клеточных механизмов, обеспечивающих регенерационные процессы. Таким образом, даже имея полные данные о механизмах регенерации только для одного вида из огромного и очень разнообразного класса Demospongiae, мы не можем делать каких-либо обобщений относительно механизмов регенерации этого класса, а тем более типа Porifera. Поэтому

настоящее исследование было направлено на детальное изучение механизмов репаративной регенерации средиземноморской губки *Aplysina cavernicola*, нового перспективного объекта Evo-devo [12]. Мы использовали широкий спектр методов, обеспечивших всесторонний анализ клеточных механизмов регенерации у этого вида, включая поведение и миграции клеток, морфогенетические процессы, пролиферацию клеток и апоптоз [12]. Полученные нами результаты позволили по-новому взглянуть на эволюцию клеточных механизмов регенерации у Metazoa [12].

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Изучение регуляции развития, морфогенезов нормального развития и эволюции планов строения книдарий [1]

Колонии *Dynamena pumila* были собраны на Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова в июне - июле. Колонии со зрелыми яйцеклетками собирали во время отлива и содержали в лаборатории при температуре 14-16° С в природной морской воде (NSW). Эмбрионы и личинки-планулы содержались в чашках Петри при температуре 18°С в NSW, профильтрованной через фильтры Millipore (0,24 мкм) (FNSW). Личинок стимулировали к метаморфозу путем обработки 100 мМ CsCl [15]. Прижизненные наблюдения проводились под стереомикроскопом Leica M165C.

Для световой микроскопии образцы фиксировали в 2,5% глутаральдегиде в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2), а затем пост-фиксировали в 1% тетроксиде осмия на том же буфере. Затем образцы обезвоживали проводкой через серию концентраций этанола и ацетона, а затем пропитывали заливочной средой Epon812. Срезы образцов были получены с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Reichert Ultracut E. Полутонкие срезы окрашивали 1%-ным толуидиновым синим в 1%-ном тетраборате Na и исследовали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axiovert 25 CFL с цифровой камерой Zeiss AxioCam HRc.

Для фармакологических экспериментов побеги колоний подвергались воздействию веществ с начала формирования нового междузлия. Личинки были инкубированы в химических веществах с начала метаморфоза. 1-Azakenpaullone (Sigma, A3734) использовали для сWnt каскада. Ингибитор Tcf/ β -катенина iCRT14 использовали для ингибирования сWnt каскада (Sigma, SML0203). Все реагенты растворяли в ДМСО в более высоких концентрациях, а затем разбавляли в FNSW до конечных концентраций. Рабочие растворы обновлялись ежедневно.

Гибридизацию *in situ* побегов и первичных полипов *Dynamena* проводили, как описано ранее [16]. Вкратце, образцы фиксировали в течение 1 мин в 0,2% глутаральдегиде / 3,7%

формальдегиде в FNSW и затем в течение дополнительного часа в 3,7% формальдегиде / FNSW. После промывки 3x РТw (1x PBS с 0,1% Tween 20) образцы переносили в метанол и хранили при 20°C. Образцы гидратировали с помощью РТw и обрабатывали 80 мкг / мл протеиназы К в течение 3 минут. Образцы гибридизовали при 62°C с мечеными дигоксигенином РНК-пробами (1 нг/мкл), которые транскрибировали с линейаризованных плазмид, содержащих гены *Dynatena*. После обработки антителами против дигоксигенина, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Roche; ref. 11093274 910, разбавление 1/2000), проводили цветную реакцию с BCIP / NBT (Roche). Для увеличения сигнала экспрессии некоторых генов (например, *Wnt3*) мы разрушали хитиновый перисарк колонии с помощью хитиназы (1 мг/мл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Для гидрантов был использован метод гибридизации *in situ* на основе мочевины [17]. Окрашенные образцы промывали РТw, монтировали в 87% глицерине и наблюдали под микроскопом Leica DM2500.

Обратная транскрипция, ПЦР и количественная ПЦР в реальном времени: 1 мг тотальной РНК использовали для синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы М-MLV (Евроген, Россия). ПЦР проводили на термоциклере MJ Mini (BioRad, США) с использованием энциклополимеразы (Евроген, Россия) и специфических олигонуклеотидов. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мг/мл). Количественную ПЦР проводили с использованием реакционной смеси Step One plus (Applied Biosystems) и Syber-Green / ROX (Евроген, Россия). Относительные уровни экспрессии рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ с поправкой на эффективность [18].

Полученные изображения были обработаны с помощью программы Photoshop CC. Для обработки использовались следующие инструменты: «Уровни» для канала RGB, «Яркость», «Контрастность» и «Экспозиция». Все инструменты были применены ко всему изображению, а не локально.

Нуклеотидные последовательности генов *Dynatena*, использованные в этом исследовании, были загружены в GenBank: *Dp-bral* (МК005873), *Dp-bra2* (МК005874), *Dp-wnt3* (МК005877), *Dp- β cat* (МК005875), *Dp-tcf* (МК005876), *DpfoxA* (МК005878), *Dp-GAPDH* (МК005879). Собранный транскриптом *Dynatena*, использованный в этом исследовании, был загружен в DDBJ / ENA / GenBank под номером GHMC00000000.

3.2.2 Изучение регенерационных процессов губок и ранних этапов их эволюции [12]

Aplysina cavernicola (Vacelet, 1959; Demospongiae, Verongida) - это многолетний средиземноморский вид, обитающий на т.н. коралигенных формациях (биогенных элементах рельефа морского дна) или у входа в подводные пещеры, как правило, между 8 и 60 м. Для экспериментов по регенерации образцы *A. cavernicola* были собраны при погружении с аквалангом в сентябре - ноябре 2017 г., июле - августе и октябре 2018 г. и в марте 2019 г. вблизи острова Мэр, Марсель на глубине 12-15 м. Собранные губки содержались в лабораторном аквариуме объемом 100 л с NSW при температуре 15-16°C.

Были проведены два типа хирургических операций: (а) на месте, и (б) в лаборатории. Для операций на месте было использовано шесть губок. У каждой губки раны стенки тела имели одинаковый размер: 3 см² по площади и 1 см в глубину. Каждую рану измеряли и фотографировали через 0, 2, 7, 12 и 32 дня после операции с использованием цифровой камеры Nikon D300, снабженной водонепроницаемым корпусом SUBAL ND300 и вспышкой INON Z 240. Хирургические операции в лаборатории выполняли как иссечение небольшой части (приблизительно 0,3-0,5 × 0,3-0,5 см) стенки тела. Всего в экспериментах по регенерации стенки тела было задействовано 24 губки. Хирургические операции выполнялись вручную под стереомикроскопом с использованием скальпеля. После операций губки с удаленной стенкой тела содержались в лабораторном аквариуме объемом 100 л с естественной морской водой при температуре 15-16°C. Регенерирующие губки наблюдались с использованием стереомикроскопа Leica M165FC (Leica), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 320 (Leica). Наблюдения проводились через 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 и 120 часов после операции (hpo).

Образцы фиксировали в течение ночи при 4°C с помощью 2,5% глутарового альдегида (Ted Pella) на 0,2 М какодилатном буфере (pH 7,4), а после этого постфиксировали в течение 2 часов с 1% OsO₄ (SPI) на том же буфере при комнатной температуре. Между фиксацией и постфиксацией образцы дважды промывали какодилатным буфером в течение 30 минут. Наконец, образцы дегидратировали в серии этанола при комнатной температуре и хранили в 70% этаноле при 4°C. Для полутонких срезов и ТЭМ образцы были залиты эпоксидной заливочной средой Araldite (Sigma-Aldrich). Полутонкие срезы (1 мкм) получали на ультрамикротоме (Reichert) и ультрамикротоме Power-Tome XL (RMC Boeckeler), а затем окрашивали смесью 1% толуидиновый синий - 0,2% метиленовый синий. Полутонкие срезы изучали под микроскопом WILD M20 (Wild). Цифровые фотографии были сделаны с помощью микроскопа Leica DMLB (Leica).

Ультратонкие срезы (60-80 нм) получали с помощью Leica UCT6 и Ultramicrotome PowerTome XL, оснащенных алмазным ножом Drukkert 45°, и контрастировали 4% водным уранилацетатом. Ультратонкие срезы изучали на просвечивающем электронном микроскопе Zeiss-1000 (Carl Zeiss). Для СЭМ фиксированные образцы подвергали сушке в критической точке, напыляли золотом-палладием и наблюдали под микроскопом Hitachi S 570 (Hitachi).

В исследованиях пролиферации клеток было использовано 27 губок с удаленной стенкой тела. В качестве метки для пролиферации клеток использовался EdU (Thermo Fisher Scientific), который включается в ядерную ДНК во время ее синтеза в S-фазе и маркирует ДНК-синтезирующие клетки. Исходный раствор EdU готовили в ДМСО (MP Biomedicals). Оптимальная концентрация EdU и время инкубации были выяснены в ходе предварительных исследований с интактными тканями *A. cavernicola*. Мечение ДНК-синтезирующих клеток в регенерирующих губках проводилось в следующие периоды времени: 0-6, 6-12, 0-24, 24-48, 48-72 и 120-144 hpo. Концентрация EdU в экспериментах с 6-часовым инкубационным периодом составляла 600 мкМ, а в экспериментах с 24-часовым инкубационным периодом - 200 мкМ. Три губки были использованы в каждый период времени. Три губки, культивировавшиеся в FNSW без EdU служили в качестве отрицательного контроля. Пролиферацию клеток также изучали в интактных тканях *A. cavernicola*. Три губки инкубировали в течение 6 часов в FNSW с 600 мМ EdU и три губки - в течение 24 часов в FNSW с 200 мМ EdU. Одна губка служила в качестве отрицательного контроля.

После инкубации с EdU губки были дважды промыты FNSW и зафиксированы 4% PFA (Sigma-Aldrich) в PBS (Amresco, Inc.) в течение 12-15 часов при 4 ° C. Фиксированные образцы были промыты PBS, и реакция Click-iT была проведена в следующей смеси: 4 мМ CuSO₄ (ChimMed), 20 мг / мл L-аскорбата натрия (Sigma-Aldrich) и 10 мкМ азида сульфацианина 3 (Lumiprobe) в PBS. Наконец, образцы несколько раз промывали PBS и окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich).

Четыре губки были использованы для изучения апоптоза во время регенерации и в неповрежденных тканях. Исследования проводились с использованием наборов *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) или Click-iT Plus TUNEL Kit (Thermo Fischer Scientific). Неповрежденные ткани и поврежденные участки через 6, 12, 24 и 48 часов после операции фиксировали при 4°C с помощью 4% PFA (Sigma-Aldrich) на PBS (Amresco, Inc.). Фиксированные образцы промывали PBS и обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя для визуализации апоптотических клеток. Наконец, образцы несколько раз промывали PBS и окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich).

Окрашенные образцы помещали в 90% глицерин-DABCO (Sigma-Aldrich) и исследовали с помощью CLSM Nikon A1 (Nikon). Полученные Z-стеки и изображения были обработаны с помощью программного обеспечения ImageJ v.1.48. Подсчет ядер проводился на отдельных оптических срезах с помощью NIS Elements Viewer v. 4.5 (Nikon) и JR Screen Ruler v. 1.5 (Spadix Software). Для всех измерений были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение.

Статистический анализ был выполнен в R (R Core Team, 2019) с базовым пакетом «stats» ver. 3.6.0 (R Core Team, 2019).

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1 Изучение регуляции развития, морфогенезов нормального развития и эволюции планов строения квидарий

Для гидроида *Dynamena* характерна моноподиально ветвящаяся и растущая колония. Побег колонии состоит из повторяющихся структурных единиц или модулей, которые мы называем «междоузлиями»: двух боковых гидрантов и фрагмента побега между ними. Основной побег растет непрерывно вверх, многократно повторяя один и тот же морфогенетический цикл. Терминальный модуль является самым молодым и состоит из трех еще не дифференцированных частей: зачатков двух боковых зооидов и центральной части, которая даёт новую ВР (с1 и с2 на рисунке 3.1 В). В начале формирования нового междоузлия ВР побега имеет полусферическую форму (с2 на рисунке 3.1 В). Затем она делится на три части: центральная часть производит новый фрагмент побега с новой ВР, а боковые части дифференцируются в гидранты (с3 - с5 на рисунке 3.1 В).

Чтобы выяснить, в какой момент детерминируется судьба этих частей, мы исследовали экспрессию гена *foxA* (рисунок 3.2 А - Г), который является геном-маркером оральной области и глотки квидарий и билатерий [19, 20]. В полностью сформированных дифференцированных гидрантах *Dynamena Dp-foxA* сильно экспрессируется в эндодерме оральной области (рисунок 3.2 А). На ранних стадиях развития ВР появляются две зоны экспрессии *Dp-foxA* в оральных областях будущих гидрантов, но центральная часть ВР остается свободной от его экспрессии (рисунок 3.2 Б - Г). Таким образом, предразметка ВР побега происходит еще до физического отделения зачатков гидранта от центральной части, образующей новую ВР. Кроме того, мы исследовали пространственную экспрессию компонентов *cWnt* (*Dp-wnt3*, *Dp-βcat*, *Dp-tcf*) и генов мишеней *cWnt* (*Dp-bral* и *Dp-bra2*) во время морфогенеза ВР, чтобы проверить, могут ли эти гены регулировать формирование пространственной структуры побега.

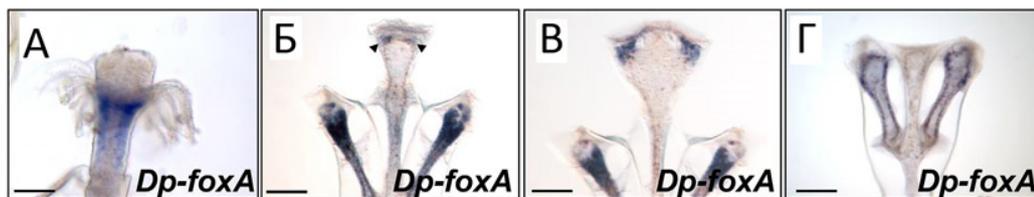


Рисунок 3.2 - Экспрессия *Dp-foxA* в гидранте (А) и в ходе развития ВР побега (Б - Г)

Мы показали, что три гена, участвующих в передаче сигналов cWnt, и, по крайней мере, два предполагаемых гена-мишени cWnt экспрессируются во время предразметки ВР развивающегося побега (рисунок 3.3). *Dp-wnt3* и *Dp-bra1* экспрессируются в апексе ВР. *Dp-βcat* и *Dp-tcf* отграничивают центральную часть ВР по линиям ее отделения от зачатков гидрантов. Паттерн *Dpbra2* обрисовывает в общих чертах зачатки гидрантов. Мы предполагаем, что эти три гена (*Dp-βcat*, *Dp-tcf* и *Dp-bra2*) могут участвовать в регуляции пространственной структуры побега.

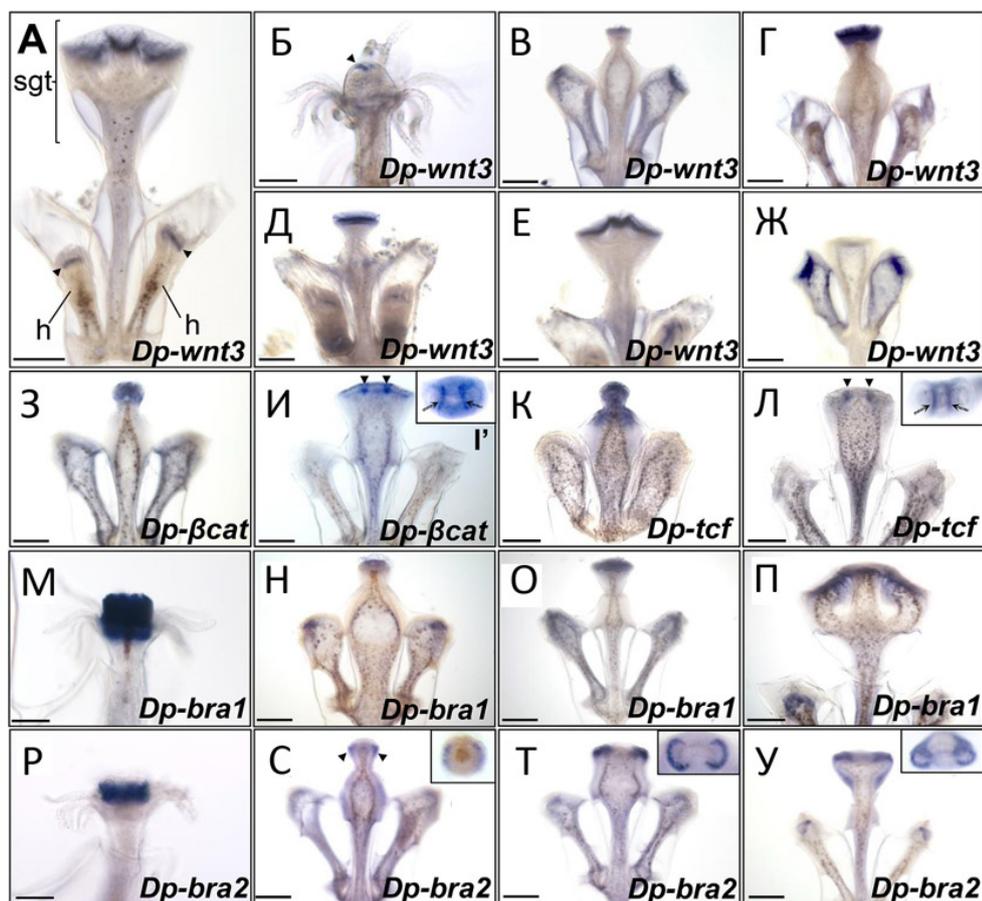


Рисунок 3.3 - Пространственные паттерны экспрессии компонентов cWnt и генов-мишеней cWnt во время морфогенеза ВР побега *Dynamena* и в гидрантах колонии. (А-Ж) *Dp-wnt3*, (З-И) *Dp-βcat*, (К-Л) *Dp-tcf*, (М-П) *Dp-bra1*, (Р-У) *Dp-bra2*. На (А) и (Б) стрелками показана область экспрессии *Dp-wnt3* в гидрантах. На (И) and (Л) стрелками показана область экспрессии *Dp-βcat* и *Dp-tcf* вдоль линий разделения зачатков гидрантов и ВР. На (С) стрелками показан бирадиальный паттерн экспрессии *Dp-bra2* в презумптивных гидрантах на ранней стадии морфогенеза ВР. Масштабный отрезок: 100 мкМ

Чтобы проверить роль cWnt в формировании предразметки ВР, мы подвергали побеги воздействию Azk или iCRT14. После 36 ч обработки 10 мкМ Azk побеги образовали новые междоузлия, лишённые центральной части, которая в норме даёт новую ВР (рисунок 3.4). Применение 10 мкМ iCRT14 вызвало мгновенную остановку морфогенеза ВР побега. Оказалось, что при модуляции активности cWnt пропадают признаки бирадиальной симметрии паттернов экспрессии генов, наблюдающиеся в нормальном развитии ВР. Так, под воздействием Azk, все изучаемые гены экспрессировались равномерно в ВР, и не исчезали из её центральной части (рисунок 3.4 Б). Обработка Azk изменяла не только пространственный паттерн экспрессии, но также повышала уровень экспрессии мРНК всех изученных генов.

Фармакологические эксперименты с первичными колониями, полученными в лаборатории из личинок-планул, показали, что небольшого изменения активности cWnt достаточно для радикального изменения пространственной организации колонии. Так, под воздействием Azk, вместо моноподиально растущей (ветвящейся) колонии, характерной для *Dynamena*, формировались столониальные колонии, характерные для других видов гидроидов, например, для хорошо известных моделей биологии развития *Hydractinia* и *Clytia hemisphaerica* (рисунок 3.4 Г - Е). Мы предполагаем, что нормальный ход морфогенеза ВР побега регулируется дифференциальной экспрессией генов, участвующих в передаче сигналов cWnt (по крайней мере, *Dp-βcat*, *Dp-tcf* и *Dp-bra2*). Вероятно, изменения паттернов экспрессии генов при увеличении активности cWnt приводили к неспособности центральной части ВР обрести свою нормальную идентичность и к неспособности ВР разделиться на три части.

3.3.2 Изучение регенерационных процессов и ранних этапов их эволюции

Несмотря на незначительные индивидуальные различия, заживление раны у *A. cavernicola*, выражающееся в эпителизации раневой поверхности, завершается в течение 2 - 6 дней (рисунок 3.5). Во время наших наблюдений мы не выявили каких-либо существенных индивидуальных различий в ходе регенерации. Регенерация заканчивается через 2 недели, когда рана полностью заживает: на её месте остается только небольшое углубление на поверхности.

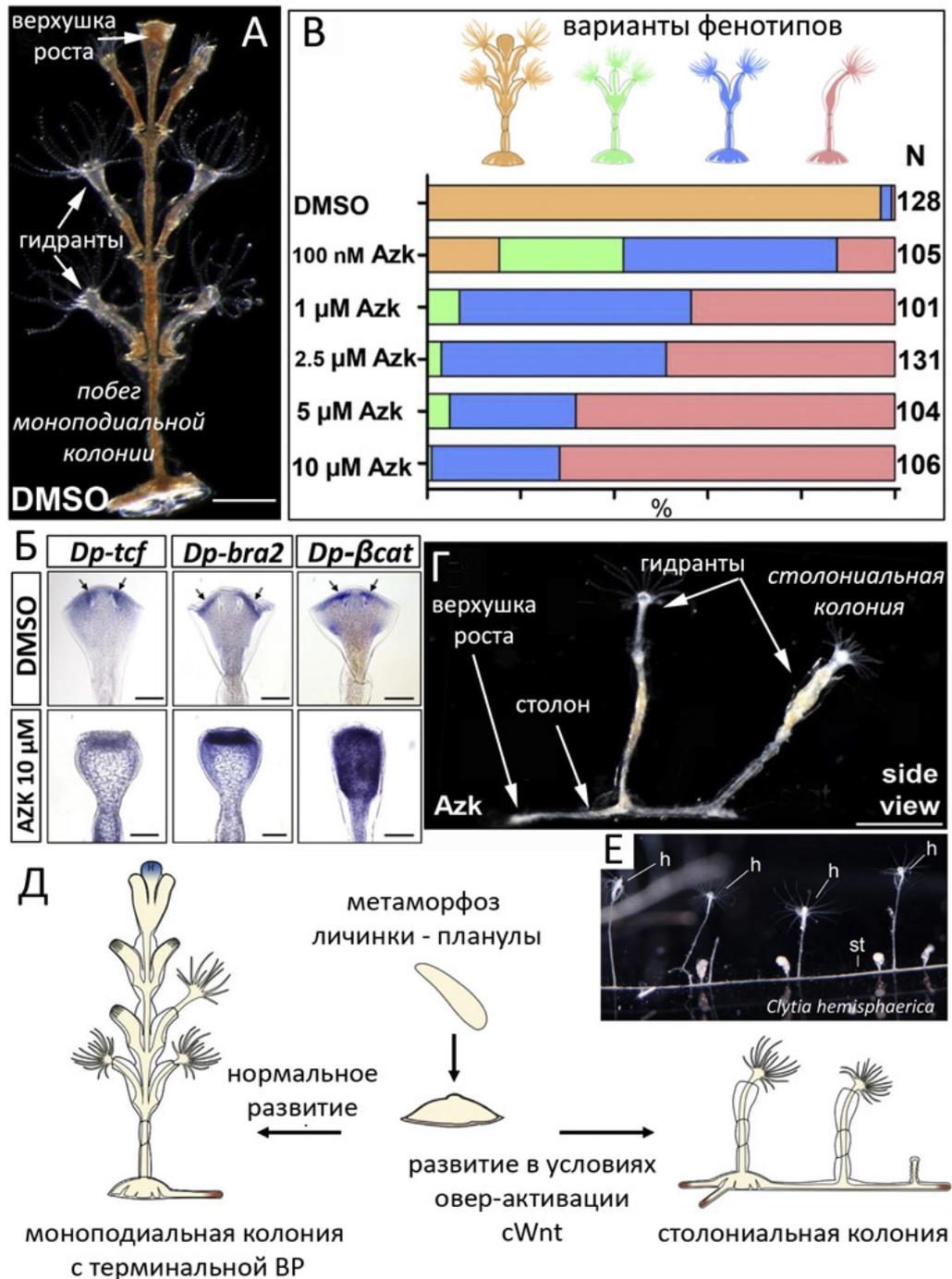


Рисунок 3.4 - Изменение плана строения колонии *Dynatena* в эксперименте по фармакологической гиперактивации cWnt сигнального пути. (А) - типичный для *Dynatena* побег колонии с терминальной верхушкой роста и моноподиальным ветвлением (контроль). (Б) - радиализация паттернов экспрессии β -catenin, TCF, Brachyury 2 при воздействии на формирующуюся колонию азакенпауллона (ингибитора GSK-3 β) (Azk). (В) - доза-зависимое изменение фенотипа молодых колоний, подвергавшихся воздействию Azk. Г - столонидальная колония, сформировавшаяся в условиях оверактивации cWnt каскада. (Д) - схема эксперимента по оверактивации cWnt каскада. (Е) - столонидальная колония гидроида *Clytia hemisphaerica*

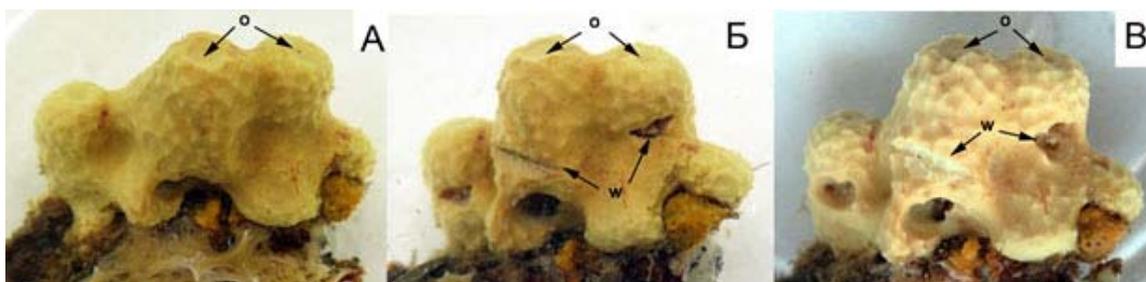


Рисунок 3.5 - *Aplysina cavernicola*, прижизненные наблюдения. (А) Неповрежденная губка перед операцией; (Б) губка сразу после операции; (В) губка через 48 часов после операции. о - оскулум; w - рана

Для стандартизации описания морфогенезов и поведения клеток, сопровождающих регенерацию, мы предлагаем разделять рану и ткани вокруг раны на несколько областей (рисунок 3.6 А). Рана: непосредственно разрыв ткани. Область раны: ткани, прилегающие к вырезанной части тела губки; их структура сильно нарушена во время операции. Край раны: периферические части раны, которые находятся в непосредственном контакте с неповрежденными тканями. Область регенерации: область тела губки (ткани), на которую хирургическое вмешательство непосредственно не влияет, но в которой анатомические структуры (камеры хоаноцитов, каналы водоносной системы и скелет) реорганизованы, а нормальный состав и распределение клеток нарушены из-за их участия в регенеративных процессах (дедифференцировки, трансдифференцировки и миграции). Размер этой области может варьироваться в зависимости от размера и типа травмы, а также от индивидуальных характеристик губки. Интактные ткани: ткани эктосомы и эндосомы, которые не подвержены хирургическому вмешательству и непосредственно не участвуют в регенерации и сохраняют нормальную организацию.

В ходе исследования мы показали, что процессы регенерации у *A. cavernicola* в целом следуют стадиям, которые описаны у других массивных губок с лейконоидной водоносной системой - *Demospongiae* и *Homoscleromorpha* [22, 23] и у различных *Eumetazoa*. На гистологическом уровне наблюдаемые процессы регенерации *A. cavernicola* можно подразделить на три этапа: (а) изоляция внутренней среды - образование «регенеративного сгустка», состоящего из внеклеточного матрикса и фрагментов клеток (3 - 12 hpo), (б) заживление раны - эпителизация (12 - 24 hpo) и (в) восстановление поврежденных структур - эктосомы и эндосомы (36 - 96 hpo).

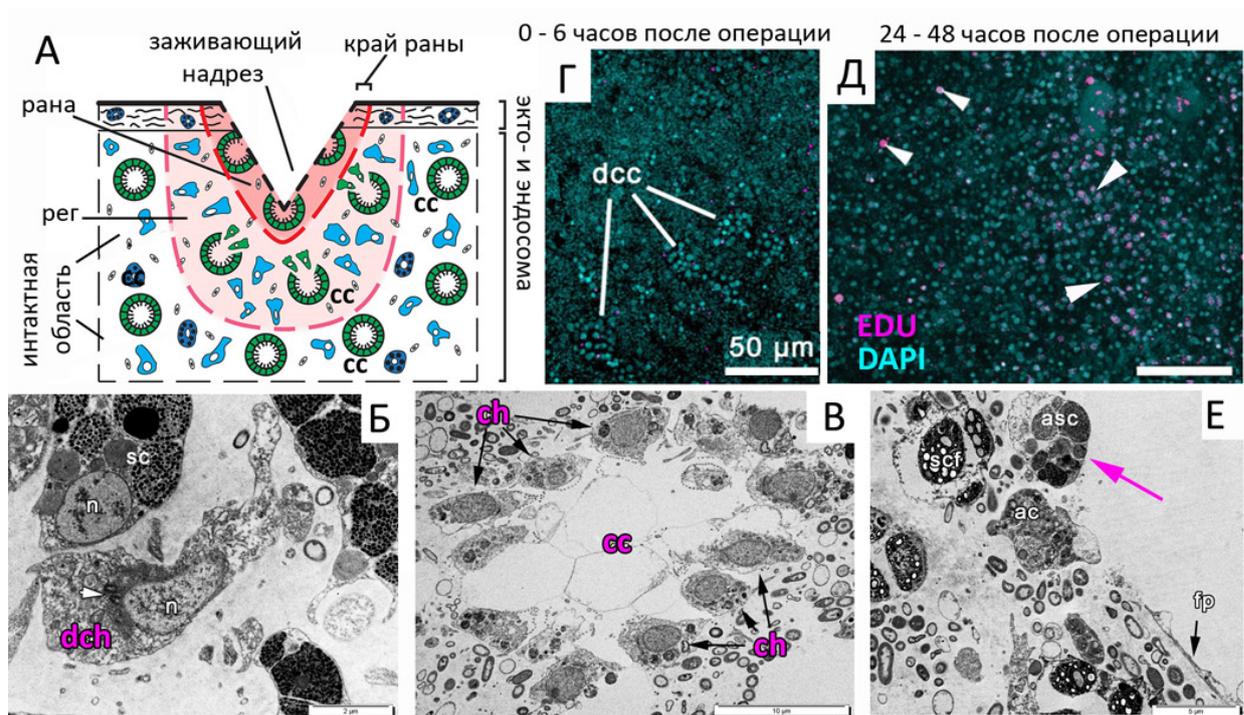


Рисунок 3.6 - Клеточные механизмы регенерации губки *Aplysina*. А - заживление надреза, нанесенного в эксперименте; рег - область, участвующая в регенерации, сс - хоаноцитная камера. Б - дедифференцированный хоаноцит (dch). В - заново сформированная хоаноцитная (ch) камера. Г, Д - пролиферация клеток (белая стрелка) на ранних (Г) и поздних (Д) стадиях регенерации; dcc - дедифференцированная хоаноцитная камера. Е - удаление гибнущей клетки из тканей губки (розовая стрелка)

Основными механизмами репаративной регенерации стенки тела *A. cavernicola* являются (а) дедифференцировка клеток с их последующей редифференциацией (рисунок 3.6 Б, В), (б) трансдифференцировка клеток и (в) активная миграция полипотентных клеток (археоцитов и хоаноцитов) в рану. Те же основные механизмы характерны и для регенерации других изученных демоспонгий. Однако эти механизмы сильно отличаются от тех, которые участвуют в процессе регенерации у известковых губок и гомосклероморф, для которых характерна эпителиальная организация тканей со специализированными клеточными контактами [24, 25].

Основным морфогенезом при регенерации стенки тела у *A. cavernicola* является мезенхимо-эпителиальный переход (МЕТ). На 12 hpo археоциты и дедифференцированные хоаноциты, а также сферические клетки начинают двигаться к области раны, где они образуют структуру, подобную бластеме. Часть внешних клеток бластемы начинает выравниваться и формировать покровный эпителий (экзопинакодерму) за счет МЕТ.

Характер клеточной пролиферации во время регенерации резко меняется (рисунок 3.6 Г, Д). Сразу после хирургической операции уровень пролиферации клеток в тканях,

прилегающих к ране, резко снижается: на 0 - 6 hpo синтезирующие ДНК клетки полностью отсутствуют в 100-мкм зоне ниже раневой поверхности (рисунок 3.6 Г). На 6 - 12 hpo и 24 - 48 hpo в тканях появляются редкие синтезирующие ДНК клетки, расположенные на 30 - 40 мкм ниже раневой поверхности (рисунок 3.6 Д). Большинство меченых клеток представляют собой хоаноциты из разрушенных камер, однако некоторые клетки мезохила также включали метку. Через 120 - 144 hpo, после восстановления структуры эктосомы и эндосомы в области регенерации, клеточная пролиферация возвращается в нормальное состояние, и большая часть синтезирующих ДНК клеток выявляется в хоаноцитных камерах. Тем не менее, уровень пролиферации клеток все еще остается более низким, чем в интактных тканях.

Мы идентифицировали два основных типа клеток, обеспечивающих восстановление утраченных тканей и структур в *A. cavernicola*: археоциты и хоаноциты. Оба типа клеток способствуют восстановлению экзопинакодермы и хоаноцитных камер. Восстановление хоаноцитных камер осуществляется в основном за счет редифференцировки хоаноцитов и в меньшей степени за счет дифференцировки археоцитов.

Мы впервые визуализировали и исследовали апоптоз при регенерации губок. Единственные предыдущие данные об участии апоптоза в регенерации губки получены из сравнительного анализа транскриптомов ранних стадий регенерации стенки тела у *Halisarca caerulea* [26]. Мы наблюдали две волны апоптоза во время регенерации *A. cavernicola*. Первая волна, начинающаяся около 6 hpo, вероятно, участвует в удалении поврежденных клеток и характерна для ранних стадий регенерации различных животных, от кишечнополостных до позвоночных [27]. Повышение уровня апоптоза на поздних стадиях регенерации *A. cavernicola* (рисунок 3.6 Е) можно назвать общим ответом ткани, связанным с восстановлением нормальной физиологии губки в области повреждения, а не с самим процессом регенерации. У планарий описан сходный поздний общий апоптотический ответ, но он участвует в интенсивном ремоделировании интактных тканей, прилегающих к ране, для восстановления надлежащих масштабов и пропорций [28].

3.4 Заключение

3.4.1 Изучение регуляции развития, морфогенезов нормального развития и эволюции планов строения кишечнополостных

Мы показали, что ключевые компоненты cWnt вовлечены в разметку ветвящегося побега колонии гидроидов и спецификацию его регионов. Это *β -catenin*, *pcf* и cWnt-зависимый ген *brachyury2*. Наши результаты доказывают, что тонкая настройка активности cWnt может быть ответственна не только за переключение между столонными и ветвящимися типами

колоний, но также и за изменения пространственной организации ветвящихся колоний. Таким образом, изменение активности cWnt могло выполнять ключевую роль в диверсификации планов строения колониальных кишечнополостных. Относительно небольшие изменения активности сигнальных путей могли приводить к драматическим преобразованиям траекторий развития и формирующихся на их основе планов строения животных.

Мы также высказали предположение о том, что cWnt путь - эволюционно первичный регулятор морфогенезов ветвления, характерных как для кишечнополостных, так и для билатерий (например, современных позвоночных). Ветвление зачатков множества органов позвоночных, таких как легкие, почки, слюнные железы и молочные железы, зависит от активности cWnt [29]. Интересно, что гиперактивация cWnt подавляет ветвление не только колонии гидроидов, но и у эмбрионов млекопитающих, например, во время морфогенеза легких и слезных желез [30]. Потребуется более широкая филогенетическая выборка объектов и тщательный функциональный анализ морфогенезов ветвления чтобы понять, являются они примером конвергентного сходства или унаследованы от общего предка.

3.4.2 Изучение регенерационных процессов и ранних этапов их эволюции [12]

Мы обнаружили, что основными механизмами регенерации являются: дедифференцировка полипотентных клеток; их активная миграция; их последующая редифференцировка или трансдифференцировка, связанная с мезенхимально-эпителиальной трансформацией (рисунок 3.6 Б, В). Было показано, что клеточные деления вносят вклад в репарацию начиная с 24го часа после нанесения раны (рисунок 3.6 Г, Д). Впервые было показано, что заживление раны у губки ассоциировано с апоптозом, способствующим удалению поврежденных клеток (рисунок 3.6 Е).

Таким образом, основную роль в регенерации губок, независимо от их таксономической принадлежности, плана строения и уровня развития эпителиальных тканей, играют процессы трансдифференцировки клеток. Именно этот механизм можно отнести к эволюционно первичным.

3.5 Список использованных источников

1 Bagaeva T.S., Kupaeva D.M., Vetrova A.A., Kosevich I.A., Kraus Yu.A., Kremnyov S.V. cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan//*Developmental Biology*. - 2019. - Vol. 456, № 2. P. 145 - 153.

2 Kayal E., Bentlage B., Pankey S.M., Ohdera A.H., Medina M., Plachetzki D.C., Collins A.G., Ryan J.F. Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits//*BMC Evol. Biol.* - 2018. - Vol. 18. P. 1 - 18.

- 3 Cartwright P. The development and evolution of hydrozoan polyp and colony form//Hydrobiologia. - 2004. - Vol. 530/531. P. 309-317.
- 4 Belousov L.V., Badenko L.A., Katchurin A.L., Kurilo L.F. Cell movements in morphogenesis of hydroid polypes//J. Embryol. Exp. Morphol. - 1972. - Vol. 27. P. 317 - 337.
- 5 Kosevich I.A., Fedosov A.E. Morphogenesis in colonial hydroids: pulsating rudiment splitting//Ontogenez. - 2008. - Vol. 39. P. 345 - 361.
- 6 Genikhovich G., Technau U. On the evolution of bilaterality//Development. - 2017. - Vol. 144 P. 3392 - 3404.
- 7 Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K., Christoph M. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra//Nature. - 2000. - Vol. 407. P. 1998 - 2001.
- 8 Sanders S.M., Shcheglovitova M., Cartwright P. Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* (Phylum Cnidaria)//BMC Genomics. - 2014. - Vol. 15, № 1. P. 406.
- 9 Lanna E. Evo-devo of non-bilaterian animals//Genetics and molecular biology. - 2015. - Vol. 300. P. 284 - 300.
- 10 Sanetra M., Begemann G., Becker M., Meyer A. Conservation and co-option in developmental programmes: the importance of homology relationships//Front. Zool. - 2005. - Vol. 2, № 1. P. 15.
- 11 Petersen C.P., Reddien P.W. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis//Cell. - 2009. - Vol. 139. P. 1056 - 1068.
- 12 Ereskovsky A.V., Tokina D.B., Saidov D.M., Baghdiguan S., Le Goff E., Lavrov A.I. Transdifferentiation and mesenchymal-to-epithelial transition during regeneration in Demospongiae (Porifera)//J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). - 2019. - P. 1 - 22.
- 13 Cavolini F. Memorie per servire alia storia dei polipi marini / Napoli, 1785.
- 14 Weltner Vol. Spongillidenstudien//U. Arch. Naturgesch. - 1893. - Vol. 59. -P. 245 - 282.
- 15 Seipp S., Wittig K., Stiening B., Bottger A., Leitz T. Metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria) is caspase-dependent//Int. J. Dev. Biol. - 2006. - Vol. 50. P. 63 - 70.
- 16 Genikhovich G., Technau U. *In situ* hybridization of starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*) embryos, larvae, and polyps//Cold Spring Harb. Protoc. - 2009. - № 9. P. pdb-prot5282.
- 17 Sinigaglia C., Thiel D., Hejnol A., Houliston E., Leclere L. A safer, urea-based *in situ* hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species//Dev. Biol. - 2017. - Vol. 434. P. 15 - 23.

- 18 Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. Highthroughput real-time quantitative reverse transcription PCR//Curr. Protoc. Mol. Biol. - 2005. - Vol. 15, № 8. P. 1 - 15.
- 19 Fritzenwanker J.H., Saina M., Technau U. Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*//Dev. Biol. - 2004. - Vol. 275. P. 389 - 402.
- 20 Martindale M.Q., Hejnal A. A developmental perspective: changes in the position of the blastopore during bilaterian evolution//Dev. Cell. - 2009. - Vol. 17. P. 162 - 174.
- 21 Kuhn A. Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsbeziehungen der Hydrozoen: die Hydroiden//Ergebnisse Und Fortschritte Der Zoologie. - 1914. - P. 1 - 284.
- 22 Brondsted H.V. The ability to differentiate and the size of regenerated cells after repeated regeneration//Quarterly Journal of Microscopy Sciences. - 1953. - Vol. 94. P. 177 - 184.
- 23 Pozzolini M., Gallus L., Ghignone S., Ferrando S., Candiani S., Bozzo M, Scarfi S. Insights into the evolution of metazoan regenerative mechanisms: Roles of TGF superfamily members in tissue regeneration of the marine sponge *Chondrosia reniformis*//Journal of Experimental Biology. - 2019. - Vol. 222, № 17. - P. jeb207894.
- 24 Ereskovsky A.V., Borisenko I.E., Lapébie P., Gazave E., Tokina D.B., Borchiellini C. *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha, Porifera) regeneration: Epithelial morphogenesis and metaplasia//PLOS One. - 2015. - Vol. 10, № 8. - P. e0134566.
- 25 Lavrov A.I., Bolshakov F.V., Tokina D.B., Ereskovsky A.V. Sewing wounds up: The epithelial morphogenesis as a central mechanism of calcarean sponge regeneration//J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). - 2018. - Vol. 330, № 6 - 7. P. 351 - 371.
- 26 Kenny N.J., De Goeij J.M., De Bakker D.M., Whalen C.G., Berezikov E., Riesgo A. Towards the identification of ancestrally shared regenerative mechanisms across the Metazoa: A transcriptomic case study in the Demosponge *Halisarca caerulea*//Marine Genomics. - 2018. - Vol. 37. P. 135 - 147.
- 27 Bradshaw B., Thompson K., Frank U. Distinct mechanisms underlie oral vs aboral regeneration in the cnidarian *Hydractinia echinata*//eLife. - 2015. - P. 1 - 19.
- 28 Cebria F., Adell T., Salo E. Rebuilding a planarian: From early signaling to final shape//International Journal of Developmental Biology. - 2018. - Vol. 62. P. 537 - 550.
- 29 Warburton D., Bellusci S., De Langhe S., Del Moral P.-M., Fleury V., Mailleux A., Tefft D., Unbekandt M., Wang K., Shi W. Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis//Pediatr. Res. - 2005. - Vol. 57. P. 26R - 37R.

30 Dean C.H., Miller L.A.D., Smith A.N., Dufort D., Lang R.A., Niswander L.A. Canonical Wnt signaling negatively regulates branching morphogenesis of the lung and lacrimal gland//Dev. Biol. - 2005. - Vol. 286. P. 270 - 286.

РАЗДЕЛ 4. ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА.

4.1 Введение

4.1.1 Энергетический обмен в постличиночном онтогенезе *Planorbarius corneus* [1]

В постличиночном периоде при переходе к образу жизни взрослых животных наблюдаются процессы, связанные, вероятно, с адаптацией к новым условиям существования. Ранее было показано, что у брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* изменение интенсивности обмена после первоначального увеличения остается постоянной в течение некоторого времени, и лишь затем кинетика изменения энергетического обмена подчиняется общим закономерностям: скорость обмена постоянно возрастает, а интенсивность - падает [2]. Увеличение скорости потребления кислорода коррелирует с нарастанием массы таким образом, что наблюдается аллометрическая зависимость между этими параметрами [3].

Цель работы - исследование закономерностей изменения скорости и интенсивности потребления кислорода в постличиночном индивидуальном развитии пресноводного брюхоногого моллюска роговой катушки *Planorbarius corneus*.

4.1.2 Индивидуальный линейный рост *Anodonta beringiana* в постличиночном онтогенезе [4]

Индивидуальный линейный рост моллюсков можно изучать путем измерения последовательных годовых колец на поверхности раковины. Для описания роста моллюсков в большинстве случаев используют уравнение Бергаланфи [5]:

$$L_t = L_\infty(1 - \exp(-c(t + t_0))) \quad (1)$$

где t - номер измеренного годового кольца, начиная от макушки раковины; t_0 - возраст моллюска для годового кольца $t = 0$; L_t - длина годового кольца в возрасте $t + t_0$; L_∞ - предельное значение длины раковины; c - константа роста.

Использование коэффициентов уравнения (1) позволяет проводить сравнительные внутривидовые, межвидовые и межпопуляционные исследования роста животных.

Цель работы - определение коэффициентов уравнения роста Бергаланфи (1) для индивидуального линейного роста пресноводного двустворчатого моллюска *A. beringiana*.

4.1.3 Индивидуальный весовой рост *Pleurodeles waltl* в постличиночном онтогенезе [6]

В большинстве работ, посвященных исследованию роста амфибий, ограничиваются личиночной стадией развития [7-9]. Рост взрослых амфибий изучают сравнительно редко [10-12].

Хотя [13] отмечает, что после метаморфоза весовой рост амфибий замедляется и хорошо аппроксимируется уравнением Бергаланфи:

$$M_t = M_\infty(1 - \exp(-c(t+t_0)))^u, \quad (2)$$

где M_t - масса тела в возрасте t ; M_∞ - предельное значение массы тела; c - константа роста; t_0 - коэффициент начальных условий; u - степенной коэффициент.

Цель работы - определение коэффициентов уравнения Бергаланфи (2) для индивидуального весового роста иглистого тритона *P. waltl* в постларвальном периоде онтогенеза.

4.1.4 Количественная оценка мантийных отпечатков у *Margaritifera margaritifera* [14]

При проведении исследований важно знать, с каким именно видом животных проводится работа. К сожалению, состояние систематики не всегда позволяет достоверно определить исследуемый вид. Поэтому выявление четких диагностических признаков имеет большое значение для определения видовой принадлежности изучаемых животных.

Для моллюсков *Margaritiferidae* описан характерный только для этого семейства способ прикрепления мантии к раковине с помощью модифицированных мантийных эпителиальных клеток и связанных с ними соединительных волокон [15]. Отпечатки мест прикрепления мантии могут служить в качестве диагностических признаков при определении принадлежности моллюсков к сем. *Margaritiferidae* [16, 17]. Кроме того, количество и размер мантийных отпечатков могут быть использованы при определении видов сем. *Margaritiferidae*. Применяемые обычно качественные признаки (многочисленные или малочисленные, хорошо или плохо выраженные отпечатки), приводят к субъективной оценке видовой принадлежности. Разработка количественных критериев, даст возможность более объективно оценить видовые особенности параметров мантийных отпечатков.

Цель работы - провести количественный анализ мантийных отпечатков на поверхности раковины *M. margaritifera* по их плотности и размеру.

4.1.5 Моллюски заповедника "Кивач" [18]

Проблема биоразнообразия является одной из основных для современной экологии. Однако список видов, обитающих на той или иной территории, остается далеко не полным. В частности, данные по малакофауне заповедника "Кивач" до сих пор отсутствовали.

Заповедник "Кивач", несмотря на небольшие размеры, содержит на своей территории практически все биотопы, характерные для Южной Карелии. Уникальность заповедника состоит в том, что его территория находится на границе, где зона смешанных лесов сменяется зоной хвойных лесов. В результате на территории заповедника присутствуют виды, типичные

как для южных, так и для северных широт.

Исследование функционирования таких "смешанных" экосистем представляет несомненный интерес. Особенно, если учесть, что в результате глобального потепления происходит процесс проникновения южных видов в северные зоны.

Цель данного исследования - описание видового состава моллюсков, обитающих в заповеднике "Кивач".

4.2 Материалы и методы

4.2.1 Энергетический обмен в постличином онтогенезе *Planorbarius corneus*

Моллюсков *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Planorbidae) разводили в лабораторных условиях. Вылупившихся моллюсков содержали в отстоянной водопроводной воде при постоянной температуре 20°C поодиночке в пластиковых стаканах объемом 50 мл. Всего исследовано 9 животных.

Скорость потребления кислорода измеряли с помощью оксиметра Orion Star A223 RDO/DO portable meter (Thermo Fisher Scientific, США). Измерения проводили 2 раза в неделю, начиная с 3 нед. после вылупления вплоть до естественной гибели животных. Общую массу тела моллюсков определяли на весах Scout Pro (Швейцария) с точностью 1 мг.

Зависимость скорости потребления кислорода Q от массы тела M описывали аллометрическим уравнением:

$$Q = aM^b \quad (3)$$

Для описания кинетики изменения интенсивности потребления кислорода использовали выведенное ранее уравнение [19]:

$$q = q_{st}/(1-\exp(-k(t+t_0))), \quad (4)$$

где q - интенсивность потребления кислорода, t - возраст моллюска, q_{st} - интенсивность потребления кислорода в конечном стационарном состоянии (величина, к которой стремится q при $t \rightarrow \infty$), k - коэффициент, определяющий скорость процесса, t_0 - коэффициент начальных условий.

Аппроксимацию экспериментальных данных уравнениями (3) и (4) проводили с помощью программы Matlab (The Math-Works, Inc., США).

4.2.2 Индивидуальный линейный рост *Anodonta beringiana* в постличином онтогенезе

Раковины погибших моллюсков *A. beringiana* Middendorff, 1851 (Unionidae, Bivalvia) были собраны на северо-востоке Якутии в нижнем течении р. Колыма. Раковины фотографировали вместе с масштабной линейкой. По изображению каждого моллюска

измеряли длину раковины и каждого годового кольца с точностью 0.1 мм.

Аппроксимацию экспериментальных данных уравнением (1) проводили с помощью программы Matlab (The Math-Works, Inc., США). Сравнение коэффициентов уравнения (1) у разных моллюсков проводили методом регрессионного анализа [20].

4.2.3 Индивидуальный весовой рост *Pleurodeles waltl* в постличином онтогенезе

Окончивших метаморфоз иглистых тритонов *P. waltl* Michahelles, 1830 (Amphibia, Salamandridae) брали из аквакультуры ИБР РАН. Амфибий содержали в отстоянной водопроводной воде при постоянной температуре 20°C поодиночке в пластиковых емкостях объемом 2 л. Всего исследовано 9 самцов и 9 самок.

Общую массу тела амфибий определяли на весах Scout Pro (Швейцария) с точностью 10 мг, начиная с 3 нед после окончания метаморфоза и вплоть до естественной гибели животных с интервалом 1 нед.

Полученные данные аппроксимировали уравнением (2) с помощью программы Matlab (The Math-Works, Inc., США). Коэффициент μ считали равным 3. Обоснование выбора такого значения коэффициента приведено в предыдущей работе [21].

4.2.4 Количественная оценка мантийных отпечатков у *Margaritifera margaritifera*

Раковины моллюсков *M. margaritifera* L., 1758 (Margaritiferidae, Bivalvia) собирали в русле и на берегах рек Сюскюяййоки (бассейн Онежского озера, Карелия) и Ливойоки (бассейн р. Кемь, Карелия). Всего исследовано 30 моллюсков из популяции р. Сюскюяййоки и 13 моллюсков из популяции р. Ливойоки.

Изображения раковин со стороны перламутрового слоя получали путем их сканирования на сканере HP ScanJet 5400c (Китай). На изображениях подсчитывали число (n) мантийных отпечатков и измеряли их диаметры с точностью 1 мкм.

Площадь S проекции перламутрового слоя раковины на плоскость измеряли с помощью программы Universal Desktop Ruler 3.8 (AVPSoft, Россия). Плотность мантийных отпечатков вычисляли по формуле n/S .

Зависимость плотности мантийных отпечатков и их размеров от возраста и длины раковины моллюсков оценивали с помощью линейного регрессионного анализа [22].

4.2.5 Моллюски заповедника "Кивач"

Поиск моллюсков проводили в Государственном природном заповеднике "Кивач", расположенном в южной части Карелии (Кондопожский район).

Наземных брюхоногих моллюсков искали на деревьях, кустарниках, травах, под камнями, в лиственной подстилке, под стволами и сучьями упавших деревьев, внутри

гниющих пней и валежника, на плодовых телах грибов. В пределах поселений поиск также проводили под лежащими на земле досками, бумагой, шифером и прочими предметами.

Поиск пресноводных брюхоногих моллюсков осуществляли в прибрежной зоне водоемов на водной растительности, затонувших и плавающих стволах и ветках, камнях и грунте. Двустворчатых моллюсков искали, просматривая дно водоемов. Виды определяли с помощью общеизвестных определителей моллюсков. После определения видовой принадлежности моллюсков выпускали в те биотопы, где они были собраны.

4.3. Результаты и обсуждение

4.3.1. Энергетический обмен в постличином онтогенезе *Planorbarius corneus*

На протяжении всего исследованного периода скорость потребления кислорода и масса тела *P. corneus* постоянно возрастают. Взаимосвязь между этими параметрами определяется аллометрическим уравнением (3). Степенные коэффициенты b для разных особей широко варьируют от 0.647 до 0.944 и достоверно отличаются друг от друга ($p < 0.001$). В среднем $b = 0.795 \pm 0.053$. Сопоставимый стандартный обмен в среднем равен $a = 0.061 \pm 0.001$ мл O_2 /(ч г^b).

Интенсивность потребления кислорода на ранних этапах развития у большинства исследованных моллюсков увеличивается, достигая максимума на разные сроки, не превышающие 7 нед. Затем этот параметр имеет тенденцию к постоянному уменьшению на протяжении всего индивидуального развития. Его снижение идет на фоне постоянных колебаний. Кинетика изменения интенсивности потребления кислорода после достижения максимума хорошо аппроксимируется уравнением (4) (рисунок 4.1). Коэффициенты этого уравнения для каждого исследованного моллюска достоверно не отличаются друг от друга и равны в среднем: $q_{st} = 0.117 \pm 0.006$ мл O_2 /(ч г), $k = 0.134 \pm 0.016$ нед⁻¹.

4.3.2. Индивидуальный линейный рост *Anodonta beringiana* в постличином онтогенезе

Рост отдельных особей *A. beringiana* хорошо описывается уравнением (1). Пример аппроксимации полученных данных этим уравнением показан на рисунке 4.2. Значения коэффициентов уравнения (1) у разных особей достоверно не отличаются друг от друга. В целом для всей исследованной популяции $c = 0.062 \pm 0.011$ год⁻¹; $L_{\infty} = 155.8 \pm 19.5$ мм. Эти значения могут быть использованы для характеристики при сравнительных межпопуляционных и межвидовых исследованиях. Максимальный возраст для исследованных раковин составил 28 лет.

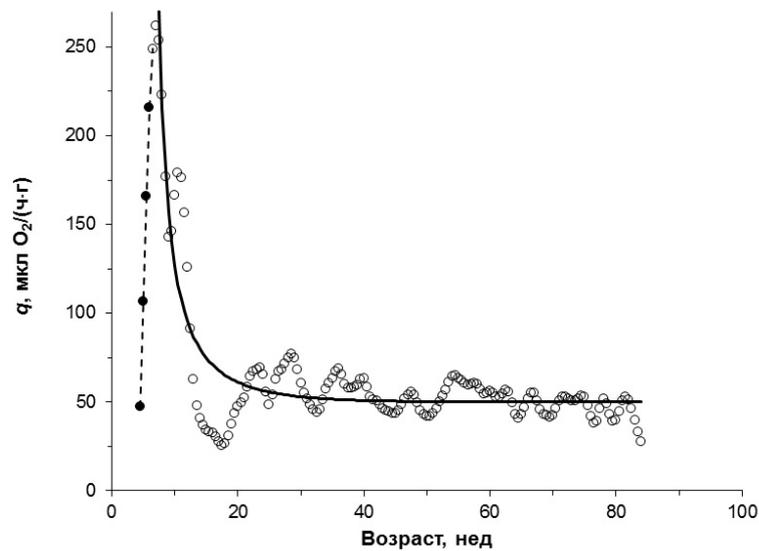


Рисунок 4.1 - Пример зависимости интенсивности потребления кислорода q от возраста моллюсков после вылупления в индивидуальном развитии *P. corneus*. Кружки - измерения. Закрашенные кружки и пунктирные линии - период первоначального увеличения q . Не закрашенные кружки - период тенденции q к снижению, описываемый уравнением (4) (сплошная линия)

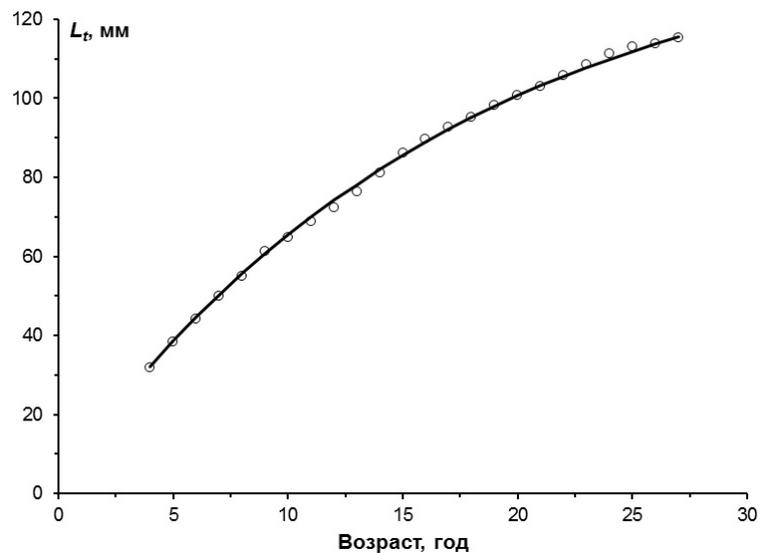


Рисунок 4.2 - Пример зависимости длины годового кольца L_t от его возраста. Кружки - измерения. Линия - аппроксимация уравнением роста Бергаланфи (1)

4.3.3 Индивидуальный весовой рост *Pleurodeles waltil* в постличиночном онтогенезе

Исследуемые амфибии прожили от 0.8 до 5.3 лет. Средняя продолжительность жизни животных составила 2.8 ± 0.3 года. К концу жизни самки достигли большей массы (39.9-51.8 г) по сравнению с самцами (20.9-33.9 г).

Кривые роста у разных особей *P. waltil* имеют сходный характер. Нарастание массы происходит постоянно вплоть до гибели амфибий по характерной S-образной кривой с одним

перегибом. Весовой рост для всего исследованного интервала возрастов хорошо аппроксимируется уравнением Берталанфи (2) (рисунок 4.3). Среднее значение константы роста s уравнения (2) составило $1.58 \pm 0.08 \text{ год}^{-1}$. Предельные размеры M_{∞} равны для самок 43.5 ± 2.0 , для самцов - $29.0 \pm 1.0 \text{ г}$.

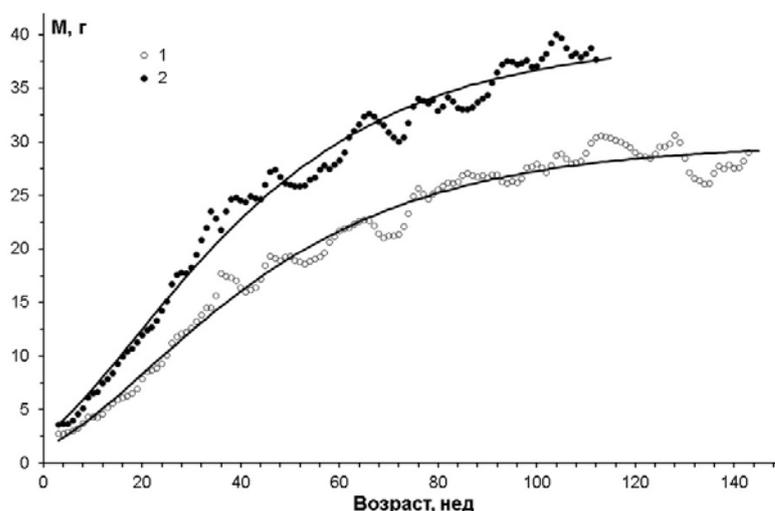


Рисунок 4.3 - Примеры изменения массы *P. waltl* в зависимости от возраста после метаморфоза. 1 - самец; 2 - самка. Линии - аппроксимация уравнением Берталанфи (2)

4.4.4. Количественная оценка мантийных отпечатков у *Margaritifera margaritifera*

Проведенный анализ показал, что по данным однофакторного дисперсионного анализа достоверные различия плотности мантийных отпечатков и их размеров не наблюдаются при сравнении: правой и левой створок, разных особей в каждой из исследованных популяций, моллюсков из разных популяций.

Зависимости плотности мантийных отпечатков и их размера от возраста не найдено. Коэффициент регрессии для зависимости плотности мантийных отпечатков от возраста равен 0.000010 ± 0.00288 отпечатков/($\text{см}^2 \cdot \text{год}$), для зависимости размера мантийных отпечатков от возраста - 0.153 ± 0.287 $\mu\text{м}/\text{год}$. В обоих случаях отличие коэффициентов регрессии от 0 не достоверно.

Для всех исследованных моллюсков плотность мантийных отпечатков варьирует от 0.37 до 1.16 и в среднем равна 0.71 ± 0.03 отпечатков/ см^2 . Размер мантийных отпечатков варьирует от 215 до 690 и в среднем равен 417 ± 2 $\mu\text{м}$.

4.3.5 Моллюски заповедника "Кивач"

Всего на территории заповедника обнаружено 25 видов моллюсков. Из них: наземных брюхоногих моллюсков - 9, водных легочных моллюсков - 9, переднежаберных моллюсков - 2, двустворчатых моллюсков - 5 видов.

Для 16 видов Южная Карелия находится внутри их ареала: *Trichia hispida*, *Cochlicopa lubrica*, *Arion subfuscus*, *A. fasciatus*, *Deroceras reticulatum*, *D. agreste*, *D. laeve*, *Lymnaea stagnalis*, *L. auricularia*, *L. lagotis*, *L. ovata*, *L. palustris*, *Physa fontinalis*, *Anisus spirorbis* (Gastropoda), *Anodonta anatina*, *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia).

Для 8 видов Южная Карелия близка к северной границе их распространения на территории европейской части России: *Fruticicola fruticum*, *Succinea putris*, *Planorbarius corneus*, *Bithynia leachi*, *Valvata piscinalis* (Gastropoda), *Anodonta cygnea*, *Unio crassus*, *U. tumidus* (Bivalvia).

Для одного вида (*Anisus borealis*, Gastropoda) Южная Карелия близка к южной границе ареала.

Приведенный список видов может служить отправной точкой для проведения дальнейших исследований, в том числе для отслеживания появления южных видов моллюсков, мигрирующих в северном направлении в результате глобального потепления.

4.4 Заключение

Динамика энергетического метаболизма и роста в онтогенезе животных изучалась в отчетный период по нескольким направлениям.

Исследовано изменение скорости и интенсивности потребления кислорода в процессе онтогенеза *Planorbarius corneus* (Gastropoda), начиная с 3 нед. после вылупления вплоть до гибели животных. Показано, что на начальных этапах развития интенсивность потребления кислорода возрастает, достигая максимума к 3-7 нед. после вылупления. Затем скорость потребления кислорода в индивидуальном развитии постоянно увеличивается, а интенсивность потребления кислорода уменьшается. Зависимости интенсивности потребления кислорода (q) от возраста (t) у отдельных особей *P. corneus* могут быть описаны уравнением вида $q = q_{st}/(1 - \exp(-k(t + t_0)))$. Значения коэффициентов этого уравнения у разных особей достоверно не различаются. Зависимости скорости потребления кислорода (Q , мл O_2 /ч) от массы тела (M , г) в индивидуальном развитии хорошо описываются аллометрическими уравнениями, степенные коэффициенты которых варьируют от 0.647 до 0.944 и достоверно отличаются друг от друга ($p < 0.001$).

Проведено исследование индивидуального линейного роста беззубки берингийской *Anodonta beringiana* (Bivalvia) путем измерения последовательных годовых колец на поверхности раковины. Показано, что рост моллюсков хорошо описывается уравнением роста Берталанфи. Коэффициенты этого уравнения у разных особей достоверно не различаются и составляют в среднем $k = 0.062 \pm 0.011$ год⁻¹; $L_\infty = 155.8 \pm 19.5$ мм.

Проведено исследование индивидуального роста иголистого тритона *Pleurodeles waltl* в аквакультуре при 20 °С, начиная с 3 нед после метаморфоза вплоть до гибели животных. Средняя продолжительность жизни животных составила 2.8 ± 0.3 года, максимальная - 5.3 года. Показано, что масса тритонов возрастает на протяжении всего исследованного периода по кривой S-образного типа. Рост хорошо аппроксимируется уравнением Берталанфи. Константы роста k из уравнения Берталанфи не зависят от пола животного.

Проведено исследование количественных признаков мантийных отпечатков у пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia) для популяций рек Сюскюняйоки и Ливойоки (Карелия). Показано, что плотность и размеры мантийных отпечатков приблизительно одинаковы у всех исследованных раковин. Эти параметры не зависят от возраста и размеров моллюсков. Согласно двухфакторному дисперсионному анализу мантийные отпечатки по поверхности раковины распределены неравномерно. При этом наблюдается достоверное ($p < 0.001$) увеличение их плотности в постериальном направлении, вентральном направлении и диагонально в постерио-вентральном направлении.

Проведено исследование видового состава моллюсков, обитающих на территории заповедника "Кивач". Всего на территории заповедника обнаружено 25 видов моллюсков. Из них: наземных брюхоногих моллюсков - 9, водных легочных моллюсков - 9, переднежаберных моллюсков - 2, двустворчатых моллюсков - 5 видов. Для восьми видов территория заповедника близка к северной границе их распространения в европейской части России, для двух видов - к южной границе.

4.5 Список использованных источников

1 Зотин А.А. Энергетический обмен в постличиночном онтогенезе *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda)//Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 5. С. 306 - 311.

2 Зотин А.А., Клеймёнов С.Ю. Скорость потребления кислорода в зародышевом развитии обыкновенного прудовика *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda)//Онтогенез. - 2006. - Т. 37, № 3. С. 167 - 172.

3 Шмидт-Ниельсен К. Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир, 1987. 159 с.

4 Зотин А.А., Попов И.Ю. Индивидуальный рост *Anodonta beringiana* (Unionidae, Bivalvia) в постличиночном онтогенезе//Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 4. С. 247 - 252.

5 Bertalanffy L. Principles and theory of growth//Fundamental aspects of normal and malignant growth. Amsterdam: Elsevier, 1960. P. 137 - 259.

6 Зотин А.А. Индивидуальный рост *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Salamandridae) в

постличиночном онтогенезе//Colloquium-journal. - 2019. - Т. 20, № 44. С. 21 - 24.

7 Владимирова И.Г., Злочевская М.Б., Озернюк Н.Д. Динамика интенсивности дыхания в раннем онтогенезе амфибий//Онтогенез. - 2000. - Т. 31, № 5. С. 350 - 354.

8 Владимирова И.Г., Клейменов С.Ю., Алексеева Т.А. Динамика массы тела и потребления кислорода в онтогенезе иглистого тритона *Pleurodeles waltl*. 2. Личиночный период развития//Изв. РАН. Сер. биол. - 2012. - № 1. С. 14 - 18.

9 Ручин А.Б. Действие монохроматического освещения на рост и развитие личинок травяной лягушки *Rana temporaria* L.//Изв. РАН. Сер. биол. - 2003. - № 5. С. 582 - 585.

10 Turner F.B. Postmetamorphic growth in anurans//Afnr. Midland Naturalist. - 1960. - Vol. 64, № 2. P. 327 - 338.

11 Guarino F.M., Lunardi S., Carlomagno M., Mazzotti S. A skeletochronological study of growth, longevity, and age at sexual maturity in a population of *Rana latastei* (Amphibia, Anura)//J. Biosci. - 2003. - Vol. 28, № 6. P. 775 - 782.

12 Farasat H., Sharifi M. Ageing and growth of the endangered Kaiser's mountain newt, *Neurergus kaiseri* (Caudata: Salamandridae), in the Southern Zagros range, Iran//J. Herpetol. - 2016. - Vol. 50, № 1. P. 120 - 125.

13 Hota A.K. Growth in Amphibians//Gerontology. - 1994. - Vol. 40, № 2 - 4. P. 147 - 160.

14 Zotin A.A., Ieshko E.P. Quantification of mantle attachment scars on the *Margaritifera margaritifera* (Margaritiferidae, Bivalvia) shell//Arctic Environ. Res. - 2019. - Vol. 19, № 2. P. 81 - 86.

15 Smith D.G. On the so-called mantle muscle scars on shells of the Margaritiferidae (Mollusca, Pelecypoda), with observations on mantle-shell attachment in the Unionoida and Trigonioida//Zool. Scr. - 1983. - Vol. 12. P. 67 - 71.

16 Smith D.G. Systematics and distribution of the recent Margaritiferidae. Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida//Ser. Ecol. Stud. - 2001. - Vol. 145. P. 33 - 49.

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

18 Зотин А.А. Моллюски заповедника "Кивач". М.: А.А. Зотин, 2019. 51 с.

19 Зотин А.А. Уравнения, описывающие изменение массы и интенсивности дыхания в постэмбриональный период развития животных//Изв. РАН. Сер. биол. - 2006. - № 4. С. 404 - 413.

20 Хальд А. Математическая статистика с техническими приложениями. М.: Изд-во иностр. лит., 1956. 664 с.

21 Zotin A.A. The united equation of animal growth//Amer. J. Life Sci. - 2015. - Vol. 3, № 5. P. 345 - 351.

22 Плохинский Н.А. Биометрия. М: Изд-во Московского Университета, 1970. 367 с.

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

5.1 Введение

Продолжая исследования влияния пренатальной гипоксии на работу сердечно-сосудистую систему в эмбриогенезе, изучали особенности гипоксического эффекта на сердечный ритм на ранних стадиях развития. Известно, что в процессе эмбрионального развития довольно часто могут наблюдаться эпизоды гипоксии разной длительности. Это может влиять на работу и формирование развивающихся физиологических систем зародыша, оказывая влияние на работу систем организма в дальнейшем после рождения, и вызывая различные заболевания. Ранее было показано, что сердечно-сосудистая система очень чувствительна к пренатальной гипоксии, и функциональные нарушения работы сердца, вызванные гипоксией в эмбриональный период, могут проявляться в постнатальный период у животных и человека. Эффект гипоксии на работу сердца в эмбриональный период зависит от уровня и длительности гипоксии и от возраста зародыша, поскольку регуляция работы сердца формируется в эмбриогенезе постепенно. Целью исследования было оценить эффект острой гипоксии разного уровня и длительности на сердечный ритм на ранних стадиях эмбриогенеза, когда нервная и гормональная регуляцию еще полностью отсутствует. Задачей нашего исследования было на экспериментальной модели куриного зародыша *in ovo* выяснить как влияет острая гипоксия (10 или 5% O₂, длительностью 10 или 20 мин) на ритм сердца сокращений зародыша на 4 сут инкубации.

5.2 Материалы и методы

Исследования проводили на курином зародыше на 4 сутки развития, когда нервная и гормональная регуляция сердца еще отсутствует. Из-за малого размера сердца для регистрации сокращений сердца зародыша *in ovo* использовали видеорегистрацию. Для этого использовали микроскоп (ОПТИКА SZM-2Led, Italy) соединенный с цифровой видеокамерой DMK 23UV024 (The Imaging Source, Bremen, Germany), и видеорегистрацию проводили непрерывно со скоростью 25 или 30 кадров в секунду. Последующую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы DanioScope (Noldus, the Netherlands). Данная программа вычисляет сердечную активность для каждого кадра как процент пикселей в интересующей области, показывая его изменение в градациях серого относительно предыдущего кадра. Во всех экспериментах мы определяли частоту сердечных сокращений

(ЧСС) за минуту и за 10 секунд. Используя также анализ Фурье, который проводили с помощью программы DanioScore. Пример регистрации активности сердца зародыша *in ovo* на 4 сут инкубации полученный с помощью программы DanioScore представлен на рисунке 5.1.

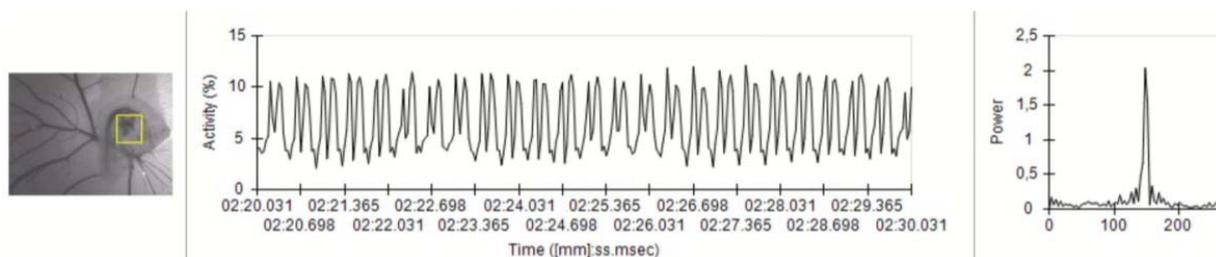


Рисунок 5.1 - Пример 10-секундной регистрации сердечного ритма куриного зародыша на 4 сут инкубации *in ovo* с помощью программы DanioScore. Правая панель представляет результат анализа Фурье, пик демонстрирует ведущую частоту сокращений сердца

5.3 Результаты и обсуждение

В контроле (в нормоксии) частота сокращений сердца была стабильной и составляла 164 ± 2.5 уд/мин. Гипоксия среднего уровня (10 мин 10% O₂) не вызывала достоверного изменения ЧСС. Однако гипоксия высокого уровня (5% O₂; 10 или 20 мин) вызывала значительное снижение ЧСС, после чего на фоне продолжающейся гипоксии наблюдалось частичное восстановление ЧСС. Падение ЧСС составляло около 30%, а при частичном восстановлении на фоне гипоксии ЧСС составляла около 10% от величины в контроле. При восстановлении в нормоксии ЧСС достоверно не отличалась от контрольной величины. Возникает вопрос, за счет каких механизмов может происходить обнаруженный двухфазный гипоксический ответ сердечного ритма у раннего зародыша? Ранее мы обнаружили сходный двухфазный гипоксический ответ сердечного ритма на 10 и 14 сут инкубации куриного зародыша и предположили, что это частичное восстановление частоты сокращений сердца на фоне гипоксии происходит за счет участия в нем развивающейся нервно-гормональной регуляции сердечной активности у зародыша [1]. В отличие от продвинутых стадий развития, на 4 сут инкубации у куриного зародыша нервно-гормональная регуляция отсутствует, газообмен происходит только за счет диффузии через поверхность зародыша, сердце не имеет коронарного кровообращения [2, 3]. Мы предположили, что факторы, присутствующие в желточном мешке, могут участвовать в двухфазном гипоксическом ответе сердечного ритма на ранних стадиях развития. Известно, что в желтке у птиц присутствуют различные физиологически активные вещества, такие как, катехоламины, серотонин, стероидные гормоны [4, 5]; катехоламины также были обнаружены в желточном мешке у крыс [6]. Чтобы

оценить возможное участие факторов желточного яйца в обнаруженном нами феномене планируется провести исследования на изолированном сердце и сравнить данными *in ovo* и *in vitro*.

5.4 Заключение

На ранних стадиях развития куриного зародыша впервые обнаружен двухфазный гипоксический ответ сердечного ритма, а имне сердце зародыша при гипоксии может после первоначальной брадикардии частично восстанавливать ритм сокращений сердца. Предполагается, что вещества, присутствующие в желтке, такие как катехоламины, стероидные гормоны, серотонин, ангеотонзин, могли бы участвовать в этом частичном восстановлении ЧСС зародыша на ранних стадиях развития при гипоксии. Планируются исследования на изолированном сердце и сопоставить результаты *in ovo* и *in vitro*. Полученные данные могут помочь в дальнейшем в поиске антигипоксических средств, эффективных для функционирования сердечно-сосудистой системы в пренатальный период развития.

5.5 Список использованных источников

1 Nechaeva M., Vladimirova I., Alexeeva T. Effect of acute hypoxia on the motor activity and heart rate of the 10-and 14-day chick embryo//Open Ornithol. J. - 2010. - № 3. P. 127 - 133.

2 Burggren W., Warburton S., Slivkoff M. Interruption of cardiac output does not affect short-term growth and metabolic rate in day 3 and 4 chick embryos//J. Exp. Biol. - 2000. - Vol. 203. P. 3831 - 3838.

3 Crossley D., Altimiras J. Ontogeny of cholinergic and adrenergic cardiovascular regulation in the domestic chicken (*Gallus gallus*)//Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. - 2000. - Vol. 279. P. R1091 - R1098

4 Ignarro L., Shideman F. Norepinephrine and epinephrine in the embryo and embryonic heart of the chick: uptake and subcellular distribution//J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1968. - Vol. 159. P. 49 - 58.

5 Engelhardt N., Henriksen R., Groothuis T. Steroids in chicken egg yolk: Metabolism and uptake during early embryonic development//Gen. Comp. Endocrinol. - 2009. - Vol. 63. P. 175 - 183.

6 Schlumpf M., Lichtensteiger W. Catecholamines in the yolk sac epithelium of the rat//Anat. Embryol. - 1979. - Vol. 156. P. 177 - 187.

РАЗДЕЛ 6. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ.

6.1 Введение

Преэклампсия - многофакторное патологическое состояние беременных женщин, которое проявляется после 20 недель беременности и сопровождается высоким процентом материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Существует несколько теорий патогенеза преэклампсии: плацентарная, иммунологическая, нейрогенная, гормональная, связанная с нарушениями мочеполовой системы, а также генетическая теория. Основным механизмом развития преэклампсии обусловлен нарушением инвазии трофобласта с последующим развитием ишемии и плацентарной дисфункции, связанной с преждевременными родами. При этом внеклеточная ДНК плода выходит из апоптотических клеток трофобласта в материнскую кровь, что может служить перспективным фактором предсказания и ранней диагностики преэклампсии и преждевременных родов.

6.2 Материалы и методы

Было проведено исследование 16 беременных пациенток с преэклампсией (8 случаев ранней преэклампсии и 8 случаев - поздней), а также 16 пациенток с преждевременными родами и 21 пациентка с неосложненной беременностью и своевременными родами (норма). Концентрацию внеклеточной ДНК плода определяли методом ПЦР-анализа посредством выявления гиперметилированного участка гена RASSF1A. Иммуногистохимическое исследование было проведено на парафиновых срезах плаценты. Для этого были использованы первичные поликлональные антитела к рецепторам ZBP-1 в синцитиотрофобласте.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения MedCalc Statistical, SPSS Statistic 20 (IBM). Различия были значимы при p меньше 0.05.

6.3 Результаты и обсуждение

Для выявления структурных и метаболических нарушений при преэклампсии и преждевременных родах было определено содержание внеклеточной ДНК плода в материнской крови пациенток, а также проведен анализ экспрессии рецепторов ZBP-1 и иммуногистохимическое исследование этих рецепторов в ворсинках синцитиотрофобласта плаценты [1].

Прежде всего, было установлено, что у пациенток, входящих в экспериментальную группу, и пациенток, относящихся к контрольной группе, отсутствуют достоверные

различия по таким показателям как частота респираторных, сердечно-сосудистых, глазных, эндокринных заболеваний и патологий мочеполовой системы.

Установлено, что содержание ДНК плода у пациенток с преэклампсией заметно увеличено по сравнению с нормой (рисунок 6.1). Следует отметить, что эта закономерность не зависит от срока проявления данного заболевания. Обнаружено также, что концентрация ДНК плода при преждевременных родах не отличается от данных у пациенток с поздней преэклампсией, а также у пациенток из группы «норма». Существенно, что этот показатель у пациенток с ранней преэклампсией был достоверно выше по сравнению с пациентками с поздней преэклампсией (рисунок 6.1).

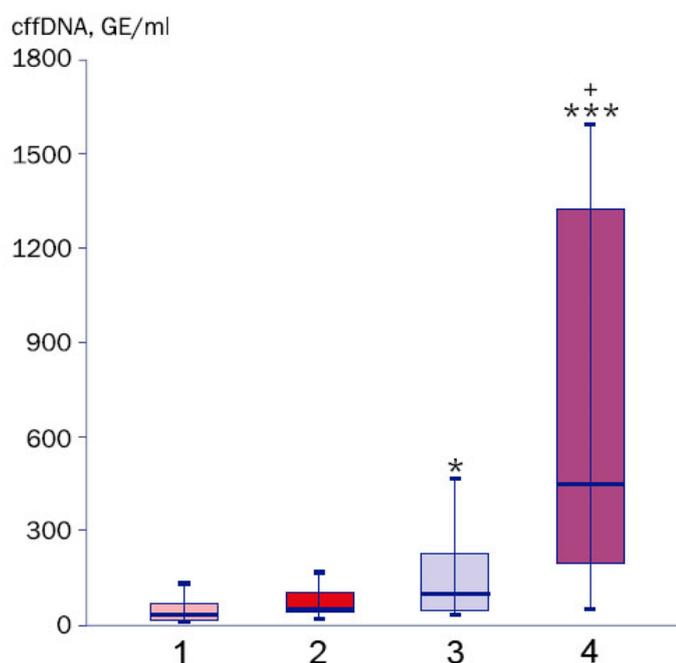


Рисунок 6.1 - Концентрация внеклеточной ДНК в материнской крови у разных групп пациенток: 1 - неосложненная беременность, 2 - преждевременные роды, 3 - поздняя преэклампсия, 4 - ранняя преэклампсия

Было проведено также иммуногистохимическое исследование экспрессии рецептора ZBP-1 в трофобластах плаценты. Иммуногистохимический анализ продемонстрировал более высокую экспрессию этого рецептора в синцитиотрофобласте ворсинок у пациенток с ранней преэклампсии по сравнению с пациентками с преждевременными родами (рисунок 6.2). Представленные данные могут свидетельствовать о том, что ранняя преэклампсия протекает с более выраженным клиническим эффектом по сравнению с поздней. Это соотношение уровней экспрессии ZBP-1 при ранней и поздней преэклампсии согласуется с

представленными на рисунке 6.1 результатами измерения концентрации внеклеточной ДНК в материнской крови на разных этапах развития данного заболевания.

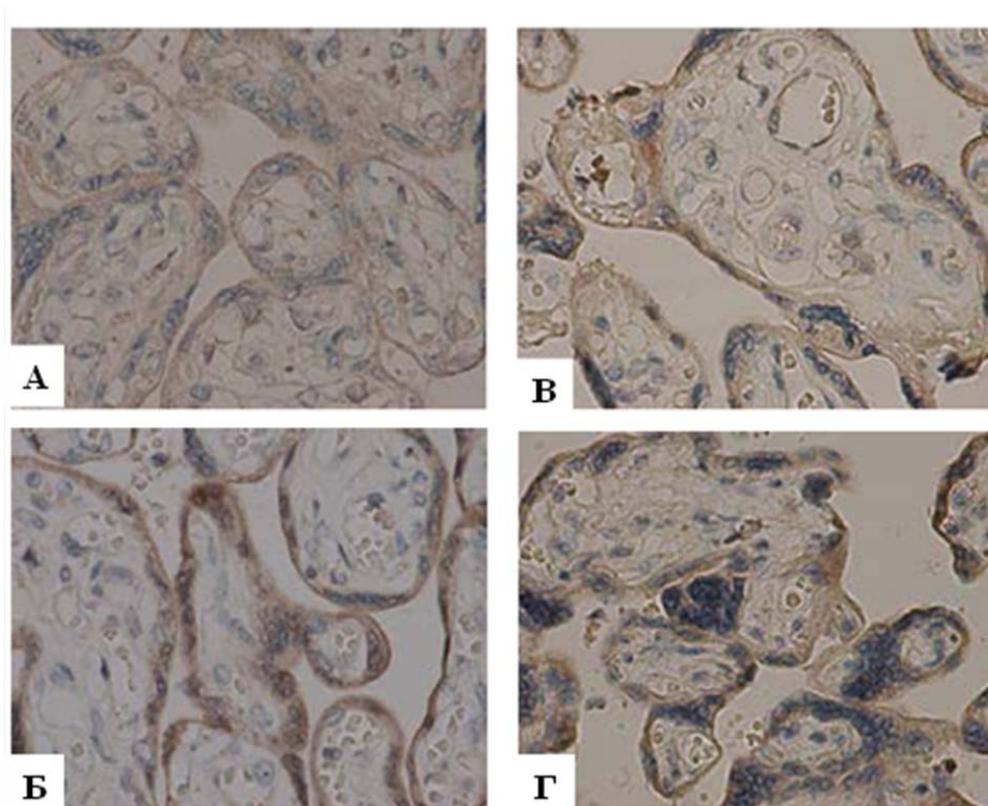


Рисунок 6.2 - Экспрессия рецепторов ZBP-1 в ворсинках плаценты у пациенток: А - преждевременные роды, Б - неосложненное течение беременности, В - доношенная беременность, Г - роды

Из этих данных следует, что фрагменты поврежденных клеток плаценты, прежде всего, клетки синцитиотрофобласта, поступают в материнский кровоток и служат источником внеклеточной ДНК плода, а также потенциальным лигандом для рецептора ZBP-1. Эти процессы носят циклический характер и способствуют дальнейшему повреждению клеток синцитиотрофобласта.

Таким образом, увеличение концентрации внеклеточной ДНК плода крови беременных пациенток и повышение экспрессии рецептора ZBP-1 в синцитиотрофобласте плаценты при преэклампсии являются взаимосвязанными процессами, которые сопровождаются значительными нарушениями морфофункционального состояния плаценты.

6.4 Заключение

1. Содержание ДНК плода у пациенток с преэклампсией заметно увеличено по сравнению с нормой.

2. Концентрация ДНК плода у пациенток с ранней преэклампсией достоверно выше, чем у пациенток с поздней преэклампсией. При преждевременных родах этот показатель не отличается от данных у пациенток с поздней преэклампсией, а также у пациенток из группы «норма».

3. Иммуногистохимический анализ показал, что экспрессия рецептора ZBP-1 в ворсинках синцитиотрофобласта плаценты более высокая у пациенток с ранней преэклампсией по сравнению с пациентками с преждевременными родами.

4. Повышение содержания внеклеточной ДНК плода крови беременных пациенток и увеличение экспрессии рецептора ZBP-1 в синцитиотрофобласте плаценты при преэклампсии - взаимосвязанные процессы.

6.5. Список использованных источников

1 Баев О.Р., Карапетян А.О., Низяева Н.В., Садекова А.А., Красный А.М. Содержание внеклеточной ДНК плода в материнской крови и экспрессия ДНК-распознающих ZBP-1 рецепторов в структурах плаценты при преэклампсии и преждевременных родах//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2019. - № 3. С. 179 - 184.

РАЗДЕЛ 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БИОМОЛЕКУЛ

7.1 Введение

Причиной изменения функциональных свойств белков, проявляющиеся в снижении активности ферментов, может быть не только изменения в активном центре или центре регуляции, но и в той большей части молекулы, которая формирует её вторичную и третичную структуру. Наиболее ярко это проявляется в регулярных структурах клетки, таких как мышечные микрофиламенты.

Изучение связи структурной стабильности с функциональными свойствами молекул имеет большое значение в диагностике некоторых заболеваний и последующем принятии плана терапии. Роль структурной стабильности белка в проявлении врождённых патологий изучали на примере точечной мутации α .

Тропомиозин (Трм) это актин-связывающий белок, который в комплексе с тропонином (Тн) играет важную роль в регуляции сокращения поперечнополосатых мышц посредством Са-зависимой модуляции актин-миозиновых взаимодействий. Тропомиозин представлен тремя изоформами α Трм, β Трм и γ Трм. α Трм присутствует, главным образом, в «быстрых» мышцах, γ — в «медленных» скелетных мышцах, а β — в мышцах обоих типов. В «быстрых» скелетных мышцах присутствуют $\alpha\alpha$ -гомомеры и $\alpha\beta$ -гетеродимеры, тогда как $\beta\beta$ -гомомеры практически не встречаются [1]. Мутации β -цепи тропомиозина — Q147P, впервые описанная в 2002 году [2], вызывающая немалиновую миопатию и мутация K49del, впервые описанная в 2008 году [3] - причина так называемой колпачковой «КЭп»-миопатии, характеризуются схожими симптомами мышечной слабости нарушения функций сократительного аппарата клеток и гистологической структуры ткани. Обе мутации проявляются уже в раннем постнатальном возрасте и служат примером того, как замена или утрата единственной аминокислоты может вызвать патологию одной из важнейших тканей организма — мышечной.

В немногих работах было показано, что указанные мутации существенно снижают сродство $\beta\beta$ -Трм к актину, но не изменяют термостабильность димера в целом. Следует заметить, что эти исследования были проведены на $\beta\beta$ -гомомерах тропомиозина, которые никогда не встречаются в скелетных мышцах, но гетеродимер из $\alpha\beta$ субъединиц составляет примерно половину тропомиозина скелетных мышц.

Задачей исследования было получить $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина, содержащие в β -цепи указанные выше мутации, и исследовать их структурную устойчивость в сравнении с нативным белком и гомодимерами, свойства которых описаны другими авторами.

7.2 Материал и методы

Исследования проводили на рекомбинантном белке с добавлением Ala-Ser на N-конце, имитирующем ацетилирование N-концевого участка нативной молекулы. Во избежание образования дисульфидных связей между субъединицами в $\alpha\beta$ -димере в качестве α -субъединицы использовали S190A мутацию, чьи свойства идентичны нативной α -субъединице в полностью окисленном состоянии [4].

Для получения мутантной формы Q147P β Trm использовали олигонуклеотид CAGGAGATGCCGCTGAAAG (мутантный кодон подчеркнут), а также два праймера GGCCCTCCAGAAGCTGAAGGGGACAGAGGATGAGGTGG и GTCCCCTTCAGCTTCTGGAGGGCCTGCTGCTCTTC для получения K49del. Экспрессию проводили в E. coli BL21(DE3).

Для изучения тепловой денатурации и доменной структуры $\alpha\beta$ Trm применяли метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Важное преимущество метода в том, что он позволяет математически разложить кривую теплопоглощения белка на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), соответствующие разным частям молекулы Trm и определить как различные мутации влияют на структуру Trm.[4, 5].

7.3 Результаты и обсуждение

Все три формы $\alpha\beta$ -Trm показали близкую калориметрическую энтальпию денатурации 510 — 550 kJ/mol и одинаковое количество калориметрических доменов (таблица 1).

Обнаружено, что мутация Q147P существенно снижает термостабильность домена 2, сформированного С-концом как $\alpha\alpha$ -Trm, так и $\alpha\beta$ -Trm димерами. Эта мутация снижает термостабильность С-концевого участка тропомиозина почти на 4 °С, не оказывая при этом влияния на термостабильность домена 3 (таблица 7.1, рисунок 7.1 Б). Замена консервативного Gln147 на Pro, который обычно отсутствует в тропомиозине из-за его негативного влияния на регулярность структуры α -спирали, должен нарушать структуру С-концевого участка, что объясняет почему мутация Q147P β -цепи тропомиозина дестабилизирует домен 2 $\alpha\beta$ -гетеродимера [5].

Таблица 7.1 - Параметры ДСК индивидуальных термических переходов (калориметрических доменов) $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp WT и Trp с мутациями Q147P и K49del в β субъединице

	^a T _{max} °C	^b ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔH (% от общей)	^b Общая ΔH (kJ·mol ⁻¹)
А β Trp WT				550
Домен 1	38.4	100	18	
Домен 2	40.3	290	53	
Домен 3	48.7	160	29	
А β Trp Q147P				510
Домен 1	31.1	45	9	
Домен 2	36.4	215	42	
Домен 3	48.6	250	49	
А β Trp K49del				530
Домен 1	28.0	50	9	
Домен 2	41.0	100	19	
Домен 3	54.9	380	72	

^aошибка T_{max} не превышает ± 0.2 °C; ^bотносительная ошибка не превышает 10%.

Мутация K49del сдвигает тепловой переход третьего домена более чем на 6 °C в сторону высоких температур, одновременно существенно увеличивая энтальпию этого домена [5], снижая в то же время энтальпию энтальпию второго домена без изменения температуры его теплового перехода (рисунок 7.1 В, таблица 7.1).

7.4 Заключение

Полученные результаты наглядно демонстрируют существенные структурные отличия исследованных $\alpha\beta$ -гетеродимеров от $\beta\beta$ -гомодимеров, несущих мутации Q147P и K49del в β -цепи Trp и что $\alpha\beta$ -гомодимер является более адекватной моделью для изучения молекулярного механизма рассмотренных миопатических мутаций. Применённый впервые для исследований гетеродимеров тропомиозина метод ДСК показал изменения температур тепловых переходов и доменной структуры $\alpha\beta$ Trp. Установлено, что мутации Q147P и K49del существенно повышают термостабильность домена, связанного с N-концевым участком β -цепи тропомиозина. Этим можно объяснить существование в «быстрых» скелетных мышцах $\alpha\beta$ Trp гетеродимеров, несущих миопатические мутации Q147P и K49del в β -цепи тропомиозина.

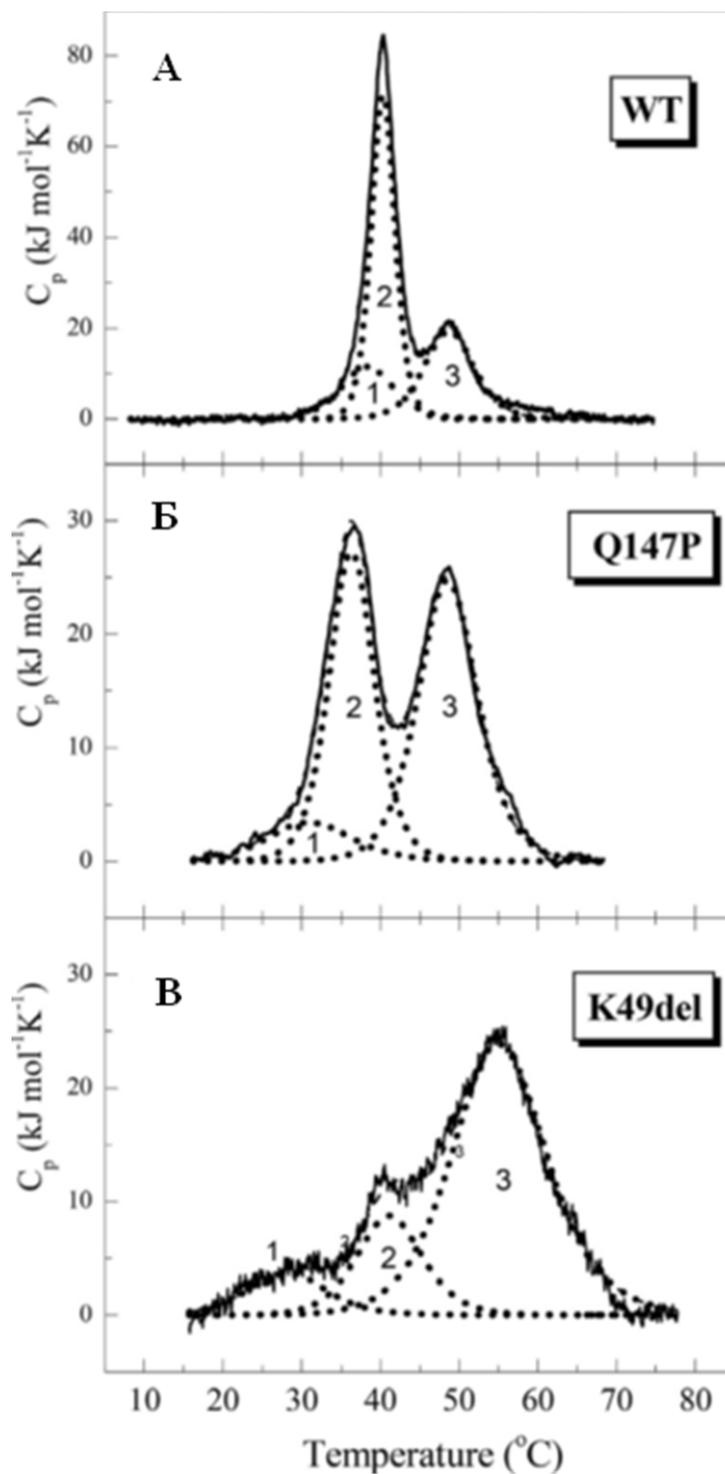


Рисунок 7.1 - Температурная зависимость избыточной теплоёмкости и результат деконволюции кривых теплоглощения $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp WT (A); и Trp содержащих мутации Q147P (Б) и K49del (B) β -цепи. Сплошная линия — исходная кривая, точечная линия показывает отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные на основе модели non-two-state

7.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Geeves M.A., Hitchcock-DeGregori S.E., Gunning P.W. A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms//J. Muscle Res. Cell Motil. - 2015. - Vol. 36. P. 147e153.

2 Donner K., Ollikainen M., Ridanpaa M. Mutations in the b -tropomyosin (TPM2) gene: a rare cause of nemaline myopathy//Neuromuscul. Disord. - 2002. - Vol. 12. P. 151e158.

3 Ohlsson M., Quijano-Roy S., Darin N., Brochier G. New morphologic and genetic findings in cap disease associated with b -tropomyosin (TPM2) mutations//Neurology - 2008. - Vol. 71. P. 1896e1901.

4 Nefedova V.V., Marchenk, M.A., Kleymenov S.Y., (...), Levitsky D.I., Matyushenko A.M. Thermal unfolding of various human non-muscle isoforms of tropomyosin//Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2019. - V. 514, № 3. P. 613 - 617. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.008.

5 Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Susorov D.S., Nefedova V.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Kleymenov S.Y., Levitsky D.I. Structural and functional properties of $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin with myopathic mutations Q147P and K49del in the β -chain//Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2019. - V. 508, №. 3. - P. 934 - 939. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.019.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование в рамках данной научной темы посвящено одной из важнейших задач современной биологии - выявлению и анализу фундаментальных механизмов регуляции онтогенеза, обеспечивающих устойчивость развивающейся системы. Решение выдвинутых задач по выяснению особенностей регуляции последовательных этапов онтогенеза проводилось на молекулярном, клеточном и организменном уровнях организации при использовании широкого круга модельных объектов, от базальных многоклеточных до позвоночных животных.

Регуляция гаметогенеза у позвоночных животных исследована на популяции Сертоли-подобных клеток (СПК) семенника мыши и растущих фолликулах яичника мыши. Дифференцировка СПК была изучена в постнатальном развитии мышей с гипер- и гипотиреозом. Оказалось, что в первом случае сперматогенез начинался значительно раньше, чем во втором. Сделан вывод о зависимости дифференцировки СПК от уровня тиреоидного гормона Т3. Получены данные, свидетельствующие о способности Сертоли-подобных клеток способствовать дифференцировке половых клеток и инициации в них мейотической программы. В целом, полученные результаты перспективны с позиции возможности использования СПК для поиска методов коррекции нарушений сперматогенеза и терапии мужского бесплодия.

В рамках исследования серотонинергической регуляции овариального фолликулогенеза в яичнике мыши показано, что основным механизмом этого процесса является захват материнского серотонина яйцеклетками с помощью мембранного транспортера серотонина SERT. Изучение экспрессии и функциональной активности SERT и декарбоксилазы DDC выявило смену источников серотонина в ооците при переходе от примордиальных фолликулов к стадии роста. Если компоненты, ответственные за синтез серотонина более выражено экспрессируются в примордиальных фолликулах, то специфический мембранный транспортер в большей степени экспрессируется в ооцитах во время роста фолликула. При исследовании генов, стабильно экспрессирующихся в GV-ооцитах мыши выявлено, что наиболее подходящими референсными генами для нормализации при количественном определении относительной экспрессии генов в GV-ооцитах мыши методом ПЦР в реальном времени являются *Gapdh*, *Rpl4* и *H2A^{fz}*. Авторы считают, что дальнейшее изучение роли эндогенных медиаторов позволит обнаружить фундаментальные механизмы регуляции раннего эмбрионального развития и всех ключевых этапов онтогенеза.

В ходе изучения молекулярных механизмов регуляции развития и клеточных механизмов регенерации представителей базальных Metazoa (Porifera и Cnidaria) удалось получить несколько результатов, позволяющих по-новому взглянуть на ранние этапы эволюции развития многоклеточных животных. Авторами показано, что ключевые компоненты канонического Wnt каскада вовлечены в регуляцию паттерна ветвления и развития архитектурно сложной колонии одного из представителей типа Cnidaria. Полученные результаты доказывают, что относительно небольшие изменения активности сигнальных путей могли приводить к драматическим преобразованиям траекторий развития и планов строения животных. Высказано предположение о том, что Wnt каскад - эволюционно первичный регулятор морфогенезов ветвления, характерных как для кишечнополостных, так и для билатерий (например, для развития легких, почек, слюнных и молочных желез современных позвоночных). В ходе изучения репаративной регенерации одного из видов Porifera, обнаружено, что основную роль в регенерации губок, независимо от их таксономической принадлежности, плана строения и уровня развития эпителиальных тканей, играют процессы трансдифференцировки клеток. Именно этот клеточный механизм репаративной регенерации можно считать эволюционно первичным.

Экспериментальными и математическими методами исследованы ростовые процессы, энергетический обмен и устойчивость процессов развития в онтогенезе ряда видов моллюсков и позвоночных животных. Показано, что рост исследованных животных хорошо описывается уравнением Бергаланфи, коэффициенты которого одинаковы для разных особей в популяции. Полученные данные по изменению интенсивности потребления кислорода в постларвальном онтогенезе моллюсков могут быть описаны выведенным авторами уравнением. Коэффициенты этого уравнения достоверно не различаются у разных особей в популяции. Полученные значения морфометрических коэффициентов линейного роста в постличиночном онтогенезе двустворчатого моллюска *Anodonta* могут быть использованы для характеристики при сравнительных межпопуляционных и межвидовых исследованиях. Охарактеризован двухфазный ответ сердца эмбриона позвоночных на воздействие гипоксии. Полученные данные могут помочь в поиске антигипоксических средств, эффективных для функционирования сердечно-сосудистой системы в пренатальный период развития. Нарушение устойчивости процессов развития часто ведет к формированию патологий. Так, нарушения инвазии трофобласта млекопитающих приводит к развитию плацентарной дисфункции и преэклампсии. Фрагменты поврежденных клеток плаценты поступают в материнский кровоток и служат источником внеклеточной ДНК плода. Показано, что

повышение содержания внеклеточной ДНК плода в крови матери и увеличение экспрессии рецептора ZBP-1 в воринках синцитиотрофобласте плаценты при преэклампсии - взаимосвязанные процессы. Таким образом, выявлены маркеры, позволяющие оценивать риск преэклампсии у человека.

Структурная стабильность макромолекул - важнейший механизм, обеспечивающий устойчивость процессов развития. Так, структура тропомиозина играет большую роль во взаимодействии с миозином и обеспечении нормального функционирования актомиозинового комплекса в целом. Известен ряд кардиомиопатологий, сопровождаемых мутациями первичной структуры тропомиозина. На примере миопатических мутаций тропомиозина (мутации Q147P и K49del) изучены последствия аминокислотных замен для термостабильности и энтальпии денатурации доменов данного белка. Продемонстрированы существенные структурные отличия исследованных $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина от $\beta\beta$ -гомомеров, несущих мутации Q147P и K49del в β цепи Trm. Установлено, что мутации Q147P и K49del существенно повышают термостабильность домена, связанного с N-концевым участком β цепи тропомиозина. Этим можно объяснить существование в «быстрых» скелетных мышцах $\alpha\beta$ Trm гетеродимеров, несущих миопатические мутации Q147P и K49del в β цепи тропомиозина. Использование гетеродимеров тропомиозина позволило отчётливее выявить свойства молекул, несущих указанные мутации. Полученные результаты дополняют наши представления о термодинамике одной из групп сократительных белков.

В 2019 году по данной теме всего 19 публикаций, из них 7 – отчетные публикации в рамках выполнения Государственного задания.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2019 ГОД

*отчетные публикации

- 1 *Baev O.R., Karapetian A.O., Nizyaeva N.V., Sadekova A.A., Krasniy A.M. Content of Free Fetal DNA in Maternal Blood and Expression of DNA Recognition Receptors ZBP-1 in Placental Tissue in Preeclampsia and Preterm Labor//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2019. - Vol. 168, № 1. P. 145 - 149. DOI: 10.1007/s10517-019-04665-z. (WoS, Scopus)
- Баев О.Р., Карапетян А.О., Низяева Н.В., Садекова А.А., Красный А.М. Содержание внеклеточной ДНК плода в материнской крови и экспрессия ДНК-распознающих ZBP-1 рецепторов в структурах плаценты при преэклампсии и преждевременных родах//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2019. - № 3. С. 179 - 184. (РИНЦ)
- 2 *Bagaeva T.S., Kupaeva D.M., Vetrova A.A., (...), Kraus Y.A., Kremnyov S.V. cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan//Developmental Biology. - 2019. - Vol. 456, № 2. P. 145 - 153. DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.08.019. (WoS, Scopus).
- 3 *Ereskovsky A.V., Tokina D.B., Saidov D.M., Baghdiguiian S., Le Goff E., Lavrov A.I. Transdifferentiation and mesenchymal-to-epithelial transition during regeneration in Demospongiae (Porifera)//J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). - 2019. - Vol. 334, № 1. P. 1 - 22. DOI: 10.1002/jez.b.22919. (WoS, Scopus)
- 4 Chebotareva N.A., Eronina T.B., Roman S.G., (...), Kleymenov S.Y., Kurganov B.I. Kinetic regime of Ca²⁺ and Mg²⁺-induced aggregation of phosphorylase kinase at 40°C//International Journal of Biological Macromolecules. - 2019. - Vol. 138. P. 181 - 187. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.240. (WoS, Scopus)
- 5 Filatov M.A., Nikishin D.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. Reference genes selection for real-time quantitative PCR analysis in mouse germinal vesicle oocytes//Zygote. - 2019. - Vol. 27, № 6. P. 392 - 397. DOI: 10.1017/S0967199419000492. (WoS, Scopus)
- 6 Gordeeva O., Gordeev A., Khaydukov S. Expression dynamics of mage family genes during self-renewal and differentiation of mouse pluripotent stem and teratocarcinoma cells//Oncotarget. - 2019. - Vol. 10, № 35. P. 3248 - 3266. DOI: 10.18632/oncotarget.26933. (WoS, Scopus)
- 7 Malolina E.A., Kulibin A.Yu. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1//Reproduction. - 2019. - Vol. 158. P 399 - 413. DOI: 10.1530/REP-19-0183. (WoS, Scopus)
- 8 *Malolina E.A., Kulibin A.Y. Creation of a model of co-culturing of sertoli-like mouse cells with spermatogonial cells//Bull Exp Biol Med. - 2019. - Vol. 167, № 4. P. 584 - 589. DOI:

10.1007/s10517-019-04576-z. (WoS, Scopus) - Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Создание модели сокультивирования Сертоли-подобных клеток мыши со сперматогониальными клетками//Клеточные технологии. - 2019. - №2. С.133 - 138.

9 *Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Susorov D.S., Nefedova V.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Kleymenov S.Y., Levitsky D.I. Structural and functional properties of $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin with myopathic mutations Q147P and K49del in the β -chain//Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2019. - Vol. 508, № 3. P. 934 - 939. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.019. (WoS, Scopus)

10 Nefedova V.V., Marchenk, M.A., Kleymenov S.Y., (...), Levitsky D.I., Matyushenko A.M. Thermal unfolding of various human non-muscle isoforms of tropomyosin//Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2019. - Vol. 514, № 3. P. 613 - 617. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.008. (WoS, Scopus)

11 *Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Y.B. Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary//Int. J. Mol. Sci. - 2019. - Vol. 20, № 12. P. 3070. DOI: 10.3390/ijms20123070. (WoS, Scopus)

12 Zotin A.A., Ieshko E.P. Quantification of mantle attachment scars on the Margaritifera margaritifera (Margaritiferidae, Bivalvia) shell//Arctic Environ. Res. - 2019. - Vol. 19, № 2. P. 81 - 86. DOI: 10.3897/issn2541-8416.2019.19.1.81. (РИНЦ)

13 Zotin A.A., Popov I.Yu. Individual Growth of Anodonta beringiana (Unionidae, Bivalvia) in Postlarval Ontogenesis//Russian journal of developmental biology. - 2019. - Vol. 50, № 4. P. 189 - 193. DOI: 10.1134/S1062360419040088. (WoS, Scopus) - Зотин А.А., Попов И.Ю. Индивидуальный рост Anodonta beringiana (Unionidae, Bivalvia) в постличиночном онтогенезе//Онтогенез. - 2019 - Т. 50, № 4 С. 247 - 252. DOI: 10.1134/S0475145019040086. (РИНЦ)

14 *Zotin A.A. Energy Metabolism in Postlarval Ontogenesis of Planorbarius corneus (Planorbidae, Gastropoda)//Russian Journal of Developmental Biology. - 2019. - Vol. 50, № 5. P. 238 - 242 DOI: 10.1134/S1062360419050096. (WoS) - Зотин А.А. Энергетический обмен в постличиночном онтогенезе Planorbarius corneus (Planorbidae, Gastropoda)//Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 5. С. 306 - 311. DOI: 10.1134/S0475145019050094. (РИНЦ)

15 Борис Д.А., Волгина Н.Е., Красный А.М., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е. Прогнозирование преэклампсии по содержанию cd16-негагивных моноцитов//Акушерство и гинекология. - 2019 - Т. 7. С. 49 - 55. DOI: 10.18565/aig.2019.7.49-55. (РИНЦ)

16 Красный А.М., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Садекова А.А., Сарибекова А.Г., Кокоева Д.Н., Салпагарова З.Х., Меджидова М.К., Вторушина В.В., Кречетова Л.В. Прогнозирование преждевременных родов путем комбинированного определения цитокинов и внеклеточной ДНК//Акушерство и гинекология. - 2019. - Т. 1. С. 86 - 91. DOI: 10.18565/aig.2019.1.86-91. (РИНЦ)

17 Красный А.М., Садекова А.А., Волгина Н.Е., Машаева Р.И., Кометова В.В., Хабас Г.Н., Голицына Ю.С., Носова Ю.В., Оводенко Д.Л. Исследование уровня метилирования гена RASSF1 в плазме и опухоли при раке эндометрия//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2019. - Т. 167, № 2. С. 223 - 227. (РИНЦ)

18 Озернюк Н.Д. История эволюционной биологии развития//Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 6. С. 424 - 434. 10.1134/S0475145019060065. (РИНЦ)

19 Садекова А.А., Хачатрян З.В., Красный А.М., Кан Н.Е., Хачатурян А.А., Тютюнник В.Л. Диагностическая значимость определения уровня внеклеточной фетальной днк у беременных с преэклампсией и задержкой роста плода//Акушерство и гинекология. - 2019. - № 8. С. 144 - 149. DOI: 10.18565/aig.2019.8.144-149. (РИНЦ)

Отчет утвержден на заседании Ученого совета 27 декабря 2019 г., протокол № 14.