## 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 Рег. № ГЗ 0108-2019-0003 Рег. № НИОКТР АААА-А19-119040290078-3

> УТВЕРЖДАЮ Врио директора ИБР РАН доктор биологических наук, член-корреспондент РАН А.В. Васильев «29» <u>декабря</u> 2020 г.

### 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 <u>29,17,2</u>070

подпись, дата

Москва 2020

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный

сотрудник, доктор биологических наук, профессор

Исполнители:

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук

Главный научный сотрудник, кандидат биологических наук

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук

Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического раздела,

кандидат биологических наук

<u>29,17,202</u>Н.Д. Озернюк (Введение, подпись, дата раздел 5)

29.12.2020А.Ю. Кулибин (раздел 1) подпись, дата

29.12.2020 Д.А. Никишин (раздел 2)

иодпись, дата 29.12.2029 Подпись, дата

*раце 19.12.202*Ю.А. Краус (раздел 3)

подпись, дата <u>29122020</u>С.В. Кремнёв (раздел 3)

подпись, дата 29.12 гого А.В. Ересковский (раздел 3) подпись, дата

<u>29,12,202</u> А. Зотин (раздел 4)

подпись, дата

9/12. Нечаева (раздел 5)

подпись, дата

С.Ю. Клейменов (раздел 6) подпись, дата

<u>29 12,207</u>Е.Б. Абрамова

подпись, дата

#### ΡΕΦΕΡΑΤ

Отчет 92 с., 6 разд., 28 рис., 1 табл., 107 источников, 12 публикаций по теме, 7 отчетных публикаций.

РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ, ЭВОЛЮЦИЯ ОНТОГЕНЕЗА, ГАМЕТОГЕНЕЗ, СПЕРМИОГЕНЕЗ, ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ, МОРФОГЕНЕЗ, ПЛАН СТРОЕНИЯ, РОСТ, ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН, 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, клеточной и молекулярной биологии.

Реконструированы морфогенетические механизмы развития сети семенника мыши. Показано, что проксимальная часть сети семенника, ближайшая к гонаде, формируется за счет трансформации клеток Сертоли половых тяжей в клетки эпителия сети семенника, и впоследствии даст начало Сертоли-подобным клеткам. На молекулярном уровне трансформации клеток Сертоли в клетки сети семенника регулируется транскрипционным фактором Pax8. С использованием маркеров пролиферации (*Mki67*, *Pcna*) и апоптоза (*Bax, Bad, Bcl2, Casp3, P53* и *Foxo3*) на органотипической культуре яичников мыши выявлены локальные механизмы влияния серотонина на функциональное состояние компонентов овариального фолликула, связанные с активностью транспортера серотонина Sert.

Показано, что донервные трансмиттеры (серотонин и дофамин) вовлечены в регуляцию перестроек цитоскелета у эмбриональных клеток морского ежа. Изучение мутантных форм тропомиозина позволило охарактеризовать молекулярные механизмы возникновения ряда наследственных миопатий сердечной и скелетных мышц человека. Установлено, что мутация E151A, ассоциированная с генерализованной мышечной слабостью, приводит к менее плотной укладке молекул в микрофиламенте.

Благодаря изучению морфогенезов нормального развития двух видов книдарий, реконструирован ряд эволюционно-первичных (эволюционно-древних, анцестральных) механизмов регуляции морфогенезов на клеточном уровне. По данным экспериментов разработана *in silico* модель, реконструирующая пространственное распределение клеточных морфологий, кинетики сил и напряжений, управляющих морфогенезом. Детальное исследование морфологии и перемещения клеток в процессе гаструляции позволило понять эволюционно

3

консервативное поведение клеток, наблюдаемое в при эпителиально-мезенхимальном переходе у многих животных.

Изучены механизмы регуляции онтогенеза на организменном уровне на примере эндогенных и экзогенных биоритмов роста и потребления кислорода у моллюсков и эмбрионов птиц. Эмбрионы птиц способны поддерживать частоту сердечных сокращений на фоне гипоксии за счет активности катехоламинергической системы.

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

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИИ И СОКРАЩЕНИИ	
ВВЕДЕНИЕ	
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И	
ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ	•••••
1.1 Введение	
1.2 Материалы и методы	
1.3 Результаты и обсуждение	•••••
1.4 Заключение	
1.5 Список использованных источников	
РАЗДЕЛ 2. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА	И
РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ	
2.1 Введение	
2.2 Материалы и методы	
2.3 Результаты и обсуждение	
2.4 Заключение	
2.5 Список использованных источников	
РАЗДЕЛ 3. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕ	3A B
РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ	
3.1 Введение	
3.2 Материалы и методы	
3.3 Результаты и обсуждение	
3.4 Заключение	
3.5 Список использованных источников	
РАЗДЕЛ 4. ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В	
ОНТОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО	
ГОМЕОСТАЗА	
4.1 Введение	
4.2 Материалы и методы	
4.3 Результаты и обсуждение	
44 Заключение	

## СОДЕРЖАНИЕ

4.5 Список использованных источников	68
РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ГИПОКСИИ И	
ТЕМПЕРАТУРЫ) НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И НЕКОТОРЫЕ	
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ. ПОИСК	
АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	71
5.1 Введение	71
5.2 Материалы и методы	71
5.3 Результаты и обсуждение	73
5.4 Заключение	76
5.5 Список использованных источников	76
РАЗДЕЛ 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ	
БИОМОЛЕКУЛ	78
6.1 Введение	78
6.2 Материалы и методы	79
6.3 Результаты и обсуждение	80
6.4 Заключение	84
6.5 Список использованных источников	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2020 ГОД	91

## ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения: ДСК - метод дифференциальной сканирующей калориметрии

КД - метод кругового дихроизма

- КЛСМ конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- СИОЗС селективные ингибиторы обратного захвата серотонина
- СПК Сертоли-подобные клетки
- СЭМ сканируюшая электронная микроскопия
- ТПМ тропомиозин
- ТН тропонин
- ТЭМ трансмиссионная электронная микроскопия
- ФСГ фолликулостимулирующий гормон
- ЧСС частота сердечный сокращений
- 5НТ 5-гидрокситриптамин, серотонин
- АМН Анти-Мюллеров гормон
- CDH1 Е-кадгерин
- CFTD врожденная диспропорция волокнистого типа
- cWnt канонический Wnt сигнальный путь
- DAPI 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DIG дигоксигенин
- DMRT1 doublesex и mab-3 связанный транскрипционный фактор 1
- EdU 5-Этинил-2'-дезоксиуридин

EGTA - этилен гликоль-бис (2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота,

- ЕМТ эпителиально-мезенхимальный переход,
- FLU флуоксетин
- FOXL2 Forkhead box L2
- HEPES 4-(2-гидроксиетил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- hpf часы после оплодотворения
- HPLС высокоэффективная жидкостная хроматография
- IC<sub>50</sub> концентрация полумаксимального ингибирования
- MFSW профильтрованная морская вода
- NRQ нормированное относительная экспрессия

- NSW природная морская вода
- РАХ8 член семейства Paired box gene транскрипционных факторов
- PBS натрий-фосфатный буфер
- PBS фосфатный буфер
- PBS фосфатный буфер
- PBST PBS и 0,01% тритона X100
- РСР планарная полярность клеток
- РFА параформальдегид
- PTw PBS и 0,1%Tween
- SF1 стероидогенный фактор 1
- SOX9 SRY-Box транскрипционный фактор 9
- SRY фактор азооспермии, регион Ү-хромосомы, определяющий пол
- TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling,
- WT1 белок опухоли Вилмса 1

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Выявление фундаментальных механизмов регуляции онтогенеза, обеспечивающих устойчивость развивающейся системы – одна из важнейших задач современной биологии развития. Уникальность исследования состоит в использовании широкого круга модельных объектов, от базальных многоклеточных (тип Cnidaria) до позвоночных животных (птицы и млекопитающие). Кроме того, исследование объединяет последовательные этапы онтогенеза, от гаметогенеза до постнатального развития и уровни организации, от молекулярного и клеточного до организменного. Это позволяет использовать полученные данные для сравнительного и эволюционного анализа регуляторных механизмов онтогенеза Мetazoa.

Изучение развития, строения и работы мужской и женской репродуктивной системы животных необходимо для понимания механизмов регуляции и эволюции процессов гаметогенеза. В рамках этого направления изучалось развития сети семенника, а также регуляция активности яичника млекопитающих. Эти исследования имеют, наряду с фундаментальным, и потенциальное прикладное значение.

Формирование сети семенника, начинающееся еще на стадии бипотенциальной гонады, - важный этап дифференцировки мужской половой системы млекопитающих. Сеть семенника – это система полостей и каналов, по которым идет транспорт сперматозоидов из гонады. Она соединяет извитые семенные канальцы с экстратестикулярными выносящими канальцами. Развитие сети семенника до сих пор оставалось практически неизученным. Нашей целью было подробное изучение стадий развития сети семенника в эмбриогенезе мыши и выявление роли эмбриональных клеток Сертоли в её формировании. Мы также исследовали механизмы регуляции функциональной активности яичника млекопитающих. Известно, что одной из универсальных в животном мире функций серотонина является регуляция женской репродуктивной функции на всех ее этапах. В наших предыдущих исследованиях было показано, что наиболее вероятным эффектором серотонинергической регуляции фолликулов. В рамках данной работы проведено исследование механизмов влияния серотонина и флуоксетина на функциональное состояние клеточных компонентов овариального фолликула в условиях органотипической культуры яичников мыши.

Механизмы, обеспечивающие устойчивость процессов развития на субклеточном и молекулярном уровнях, изучались на примере двух модельных систем: ранних эмбрионов морского ежа и скелетных/сердечных мышц млекопитающих. Существует гипотеза о том, что различные элементы цитоскелета могут являться мишенями сигнальных каскадов,

регулируемых нейротрансмиттерами. С целью проверки этой гипотезы, мы исследовали влияние антагонистов серотониновы дофаминовых рецепторов на состояние актинового и тубулинового цитоскелета раннего эмбриона морского ежа *Paracentrotus lividus*. Серотонин и дофамин хорошо известны как классические донервные трансмиттеры. Они выполняют регуляторные функции в эмбриогенезе, задолго до появления первых нервных клеток, Эмбрионы морских ежей - классические объекты исследования донервных функций нейротрансмиттеров, так как для них показана высокая специфическая чувствительность к агонистам и антагонистам серотониновых, дофаминовых, адренергических рецепторов.

Механизмы поддержания структурной стабильности цитоскелета изучалась на примере молекул тропомиозина. Причиной изменения функциональных свойств белковых молекул могут быть аминокислотные замены в той части молекулы, которая формирует её вторичную и третичную структуру. Такие мутации часто приводят к развитию таких тяжелых наследственных заболеваний, как гипертрофические или дилатационные кардиомиопатии и генерализованная мышечная слабость. Задачей исследования было выявление молекулярных механизмов развития миопатий, ассоциированных с несколькими мутациями тропомиозина.

Изучение разнообразия и эволюционной истории молекулярно-генетических и клеточных механизмов регуляции морфогенезов важно для понимания причин и последствий нарушений развития, приводящих к тяжелым врожденным патологиям. Наша работа сфокусирована на изменении формы отдельных клеток в разных регионах эмбриона и на связи этих изменений с формой эмбриона как целого и с конфигурацией поля механических напряжений. Представители базальных Metazoa, книдарии (тип Cnidaria), сохранили эволюционно первичные механизмы регуляции морфогенезов, что делает их изучение очень информативным. Однако сведения о морфогенезах в нормальном развитии книдарий крайне фрагментарны. Чтобы восполнить этот пробел, мы провели исследования морфогенезов нормального развития книдарий *Clytia hemisphaerica* и *Lucernaria quadricornis*.

Один из важнейших механизмов регуляции онтогенеза на организменном уровне биоритмы. Циркадные и сезонные ритмы энергетического обмена и роста животных являются экзогенными, и определяются факторами окружающей среды. Однако для животных характерны и эндогенные биоритмы. В рамках нашего исследования анализировались эндогенные биоритмы интенсивности энергетического обмена в онтогенезе брюхоногого моллюска *Planorbarius corneus*. Изучение биоритмов роста сопряжено с необходимостью изучения длительного периода онтогенеза и необходимостью проведения регулярных измерений. Уникальным модельным объектом является двустворчатый моллюск

10

Margaritifera margaritifera. Эти моллюски часто живут более 100 лет, а наличие годовых колец на поверхности раковины позволяет получать данные за длительные промежутки времени. Выполнено исследование, цель которого - выявление биоритмов удельной скорости роста и определение индивидуальных линейных параметров роста двух популяций *M. margaritifera*.

Механизмы регуляции энергетического обмена на организменном уровне изучалась также на модели пренатальной гипоксии эмбриона позвоночных. Эпизоды гипоксии разной длительности могут наблюдаться в пренатальный период развития. Объектом нашего исследования был эмбрион курицы, развивающаяся сердечнососудистая система которого - одна из наиболее уязвимых мишеней гипоксии. Основной задачей было изучить пошаговую динамику ответа сердечного ритма 4-суточного эмбриона на острую гипоксию (5%O<sub>2</sub> 20 мин) и механизмы восстановление частоты сердечных сокращений. Также проводилось сравнение гипоксических эффектов в яйце (*in ovo*) и у изолированного сердца (*in vitro*).

Решение задач всех заявленных тематик исследования позволяет получить ряд новых и уникальных данных, существенно дополняющих наши представления о механизмах регуляции и поддержания устойчивости онтогенетических процессов.

# ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ

#### 1.1 Введение

Развитие семенника у млекопитающих хорошо изучено. У мыши оно начинается около 9.5 сут эмбрионального развития (Е9.5), когда на вентральной стороне мезонефросов появляются половые валики. Они формируются клетками целомического эпителия, покрывающего мезонефрос: за счет пролиферации и ингрессии внутрь мезонефрической мезенхимы. Позднее половые валики заселяют первичные половые клетки, мигрирующие из задней кишки. Соматические клетки гонады экспрессируют такие гены как *Sf1 (Nr5a1)* и *Wt1* [1].

Изначально половые валики бипотенциальны: могут дифференцироваться в семенники или яичники. Детерминация пола инициируется с началом экспрессии гена *Sry* в будущих поддерживающих соматических клетках мужской гонады, клетках Сертоли, для мыши это происходит на E10.5. SRY активирует экспрессию *Sox9*, который запускает дифференцировку клеток Сертоли, и всего семенника в целом. Клетки Сертоли также экспрессируют такие гены как *Amh* и *Dmrt1*. К E12.5 в семенниках формируются половые тяжи, состоящие из клеток Сертоли и первичных половых клеток [2]. К E13.5 структура половых тяжей становится более упорядоченной: они формируют петли, лежащие параллельно друг другу и переходящие в сеть более тонких тяжей на границе с мезонефросом [3, 4]. На месте этой сети позднее будет располагаться внутритестикулярная сеть семенника [3].

Сеть семенника – это система взаимосвязанных каналов и полостей. Она соединяет извитые семенные канальцы, в прошлом половые тяжи, с выносящими канальцами, в прошлом канальцами мезонефроса, и служит для транспорта сперматозоидов из гонады. Развитие сети семенника изучено недостаточно. По данным недавнего исследования [5], сеть семенника формируется из соматических клеток гонады, экспрессирующих *Sf1*, и появляется еще на стадии бипотенциальной гонады. В то же время, согласно нашему исследованию, в эпителии сети семенника находится популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), экспрессирующих как маркеры клеток Сертоли, такие как DMRT1, так и мезонефрические маркеры, такие как PAX8 и CDH1 [6].

Целью настоящей работы [7] стало определение источника происхождения СПК в эпителии сети семенника. Для этого было изучено развитие пограничного региона между

мезонефросом и гонадой между E11.5 и E16.5. Особое внимание было уделено промежутку между E12.5 и E15.5, не описанному в предыдущем исследовании [5].

#### 1.2 Материалы и методы

В работе были использованы эмбрионы разных возрастов, полученные от мышей линии C57Bl/6. Для эмбрионов старше 13.5 сут (E13.5) пол определяли, основываясь на морфологии гонады. У более ранних эмбрионов выделяли ДНК из хвоста и проводили ПЦР на ген-маркер мужской Y хромосомы *Sry*. Праймеры для *Sry*: f 5'-GCTGGGATGCAGGTGGAAAA-3', r 5'-CCCTCCGATGAGGCTGATATT-3'.

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с нормами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Из эмбрионов вырезали комплексы гонада-мезонефрос и либо готовили парафиновые срезы, либо тотальные препараты (whole-mount). В первом случае образцы фиксировали 24 ч в 10%-ном забуференном формалине, проводили по серии изопропиловых спиртов, заключали в парафин и готовили серийные срезы по 4 мкм толщиной. Для восстановления антигена стекла со срезами помещали в 10мМ цитратный буфер pH 6.0 и нагревали на водяной бане в течение 20 мин. Срезы промывали в PBS и помещали в блокирующий раствор (3% BSA, 0.1% Tween 20, 0.1% Triton X-100 в PBS) на 30 мин при 37°С. Срезы инкубировали в растворе первичных антител 1 ч при 37°С. Использовали антитела к AMH (1:50, Santa Cruz sc-6886), FOXL2 (1:200, Abcam ab5096), SOX9 (1:200, Millipore AB5535). Срезы промывали PBS и инкубировали в растворе соответствующих вторичных антител, конъюгированных с АF 555 и 594 (1:500, А-21432, А-21207, Thermo Fisher Sci.), в течение 30 мин при 37°С. Некоторые образцы далее дополнительно окрашивали первичными антителами к РАХ8 (1:10, Abcam ab53490) и DMRT1 (1:50, Santa Cruz sc-377167), сделанными в мыши. Для этого использовали М.О.М. Fitc Kit (FMK-2201, Vector Laboratories). Для визуализации ядер срезы докрашивали DRAQ5 (1:1000, 62251, Thermo Fisher Sci). На контрольных срезах, к которым не добавляли первичные антитела, окраски не наблюдали. Каждый вариант окраски повторяли на срезах с как минимум трех эмбрионов из трех пометов.

Для тотальных препаратов комплексы гонада-мезонефрос фиксировали в 4%-ном параформальдегиде 12 мин, промывали в PBS, пермеабилизировали в 3%-ном Triton X-100 ночь, инкубировали в блокирующем растворе (3% BSA, 0.1% Tween 20, 3% Triton X-100 в

PBS) 3 ч при 37°С и окрашивали первичными антителами ночь при 37°С. Использовали следующие первичные антитела: антитела к AMH, FOXL2, SOX9, к ламинину (1:200, Abcam ab11575) и WT1 (1:100, Abcam ab89901). После промывки в PBS с 0.1% Tween 20 и 0.5% Triton X-100 в течение 4-6 ч образцы инкубировали в растворе соответствующих вторичных антител, коньюгированных с AF 488, 555 и 594 [1:500, A-11055, A-21432, A-21207, Thermo Fisher Sci.), ночь при 37°С. Для визуализации базальной мембраны использовали вторичные антитела против мыши, коньюгированные с AF 555 (1:500, A-31570 Thermo Fisher Sci.). Для окраски ядер к раствору вторичных антител добавляли DRAQ5. После окраски образцы тщательно промывали в течение 4-6 ч и монтировали на стекла в заключающую среду на основе глицерина. В образцах, к которым не добавляли первичные антитела, окраски не наблюдали. Каждый вариант окраски повторяли на срезах с как минимум трех эмбрионов из трех пометов.

Все образцы фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Обработку изображений, включая деконволюцию и сборку, проводили в LAS AF программном обеспечении и в ImageJ. Для 3D-моделирования использовали тотальные препараты, с которых получали серийные оптические срезы 0.8 мкм толщиной. Эти серии импортировали в ImageJ, делали сборки, обводили линиями разных цветов половые тяжи и структуры сети семенника. На основании полученных контуров создавали 3D-модели.

### 1.3 Результаты и обсуждение

Формирование и развитие сети семенника было изучено на эмбриональных мужских гонадах между 11.5 и 16.5 сут эмбрионального развития. На E11.5 SOX9 сигнал присутствовал в клетках Сертоли внутри гонады и в единичных клетках мезенхимы мезонефроса (рисунок 1.1 А). На E11.75 SOX9+ клетки формировали кластер на антериорном полюсе мезонефроса, на границе с гонадой (рисунок 1.1 Б). Возможно, это первый признак формирования сети семенника. На E12.5 сеть семенника уже была четко видна как тяж клеток в мезенхиме мезонефроса, идущий параллельно границе с гонадой (рисунок 1.1 В). Кроме SOX9, клетки сети семенника положительно окрашивались на WT1 и PAX8.



Рисунок 1.1. - Репрезентативные фотографии эмбриональных семенников с прилежащей мезонефрической тканью

Возраст E11.5 - (А), E11.75 - (Б), E12.5 - (В). Вставки на (А) и (Б) – увеличенные изображения фрагментов срезов, обведенных пунктирной рамкой. МТ – канальцы мезонефроса. Гонады расположены антериорным полюсом влево. Изображения получены с парафиновых срезов. Масштаб: 50 мкм.

На последующие сроки сеть семенника увеличивалась и усложнялась, а также соединялась с половыми тяжами внутри гонады. Чтобы проследить развитие региона на границе между семенником и мезонефросом на этапе между E13.5 и E16.5 были созданы 3D-модели. В этих моделях половые тяжи определяли по окраске на AMH. Антитела к ламинину выявляли границы структур – как половых тяжей, так и сети семенника. Если половые тяжи соединялись друг с другом AMH-положительными перемычками, в моделях им присваивали одинаковый цвет. Красным цветом обозначали участки, в которых половые тяжи переходили в AMH-отрицательные структуры сети семенника.

Вид на модели от E13.5 и E14.5 со стороны мезонефроса представлен на рисунке 1.2 А, Г. Видно, что на E13.5 все половые тяжи соединены друг с другом со стороны мезонефроса. Тонкие структуры сети семенника (нити) соединяются с половыми тяжами в разных точках без какой-либо видимой упорядоченности (рисунок 1.2 А-В). На E14.5 сеть половых тяжей начинает распадаться (рисунок 1.2 Г). Процесс имеет выраженный антериорно-постериорный градиент. На постериорном конце гонады половые тяжи все еще объединены в большие группы, они соединяются с нитями сети семенника таким же образом, как это происходило на E13.5 (рисунок 1.2 Г, Ж). В середине семенника число половых тяжей в группе обычно равно двум-трем, перемычки между группами тяжей не окрашиваются на АМН, а внутри самих групп встречаются перемычки между половыми тяжами, окрашивающиеся на АМН лишь частично (рисунок 1.2 Г, Е). На артериорном конце каждый половой тяж присоединялся к сети семенника индивидуально посредством более толстых, чем нити, структур, обозначенных нами как тяжи сети семенника (рисунок  $1.2 \Gamma$ , Д).

Чтобы более детально проанализировать пограничную зону между семенником и мезонефросом на E14.5, была создана дополнительная 3D-модель. Для этого использовали препарат, окрашенный антителами против WT1 и AMH. Окраска на WT1 позволила очертить контуры сети семенника полностью, а не только точки контакта с половыми тяжами. На рисунке 1.3A представлена получившаяся 3D-модель без и с сетью семенника (структуры, окрашенные красным), а на рисунке 1.3Б – репрезентативные срезы этой модели с разной глубины. В этой модели повторяется антериорно-постериорный градиент в распаде сети половых тяжей. Более того, видно, что на постериорном конце половые тяжи из вентральной и дорзальной частей гонады также соединены AMH-положительными перемычками (рисунок 1.3). В центре семенника и на антериорном конце связи между половыми тяжами большей частью AMH-отрицательные, также видны и промежуточные, частично AMH-отрицательные, структуры (рисунок 1.3). Тройное окрашивание на AMH, SOX9 и базальную мембрану также показало исчезновение AMH из перемычек между половыми тяжами и формирование тяжей сети семенника из этих перемычек.



Рисунок 1.2 - 3D-модели границы между семенником и мезонефросом на E13.5 и E14.5

Фотографии получены с использованием тотальных препаратов, окрашенных антителами к АМН и ламинину. А, Г – вид на модели со стороны мезонефроса. Описание моделей – в тексте. Б, В – репрезентативные фотографии контактов половых тяжей с сетью семенника на антериорном (Б) и постериорном (В) полюсах гонады на Е13.5. Д-Ж – репрезентативные фотографии контактов половых тяжей с сетью семенника на антериорном (Д), постериорном (Ж) полюсах и в середине гонады (Е) на Е14.5. Звездочка – антериорный полюс гонады. Головки стрелок – точки, где нити сети семенника соединяются с половыми тяжами. Стрелки – тяжи сети семенника. Масштаб: 50 мкм (А, Г), 25 мкм (Б, В, Д-Ж).



Рисунок 1.3 - 3D-модель границы между семенником и мезонефросом на E14.5 Получена с использованием тотальных препаратов, окрашенных антителами к AMH и WT1. А – вид на модель со стороны мезонефроса. Б – репрезентативные срезы модели с разной глубины, номера срезов указаны в правых верхних углах срезов. Звездочка – антериорный полюс гонады. Головки стрелок – перемычки между половыми тяжами, частично не окрашенные AMH. Стрелки – тяжи сети семенника. Масштаб: 100 мкм.

Процесс распада сети половых тяжей и формирования тяжей сети семенника завершался к 16.5 сут эмбрионального развития, что видно из модели, созданной для этого срока (рисунок 1.4).



Рисунок 1.4 - 3D-модель границы между семенником и мезонефросом на E16.5 Получена с использованием тотальных препаратов, окрашенных антителами к AMH и ламинину. А – вид на модель со стороны мезонефроса. Б – репрезентативные фотографии контактов половых тяжей с тяжами сети семенника. Звездочка – антериорный полюс гонады. Стрелки – тяжи сети семенника. Масштаб: 50 мкм.

Все приведенные выше данные свидетельствуют о трансформации части половых тяжей в структуры сети семенника, а значит, и о трансформации части клеток Сертоли, которые формируют половые тяжи, в клетки сети семенника. Действительно, клетки, сочетающие в себе свойства обоих клеточных типов, присутствуют в перемычках между половыми тяжами, в тяжах сети семенника и в участках половых тяжей, граничащих с тяжами сети семенника, начиная с E14.5. АМН-положительные клетки, экспрессирующие белок сети семенника РАХ8, в семеннике возрастом E16.5 представлены на рисунке 1.5А.

АМН-отрицательные клетки сети семенника, экспрессирующие маркер клеток Сертоли DMRT1, показаны на рисунке 1.5Б.



Рисунок 1.5 - Иммунофлуоресцентная детекция клеток со смешанным фенотипом в семенниках на E16.5

Тройная окраска на РАХ8, SOX9 и AMH - (А) и на DMRT1, SOX9 и AMH - (Б). Вставки 1-3 – увеличенные изображения фрагментов срезов, обведенных пунктирной рамкой. Изображения получены с парафиновых срезов. Стрелки – РАХ8+ SOX9+ AMH+ клетки. Точки – DMRT1+ SOX9+ AMH- клетки. Масштаб: 50 мкм, 25 мкм (1-3).

В целом, данные настоящей работы свидетельствуют о том, что дистальная, близкая к мезонефросу, часть сети семенника формируется до E12.5, в то время как ее проксимальная часть, ближайшая к гонаде, формируется между E13.5 и E16.5 за счет трансформации клеток Сертоли половых тяжей в клетки эпителия сети семенника. Впоследствии именно эта часть эмбриональной сети семенника войдет в состав интратестикулярной сети семенника. Схема, суммирующая этапы развития сети семенника, представлена на рисунке 1.6.



Рисунок 1.6 - Схема развития сети семенника между Е13.5 и Е16.5

Половые тяжи закрашены зеленым, канальцы мезонефроса – серым на E13.5, когда они не окрашиваются антителами к SOX9, и красным на последующие сроки, когда они SOX9-положительны. Красным обозначена дистальная, прилежащая к мезонефросу, часть сети семенника, формирующаяся до E12.5, оранжевым, часть сети семенника, образующаяся за счет клеток Сертоли половых тяжей. В рамках указаны белки, экспрессирующиеся в каждой структуре. Звездочка – антериорный полюс гонады. Черные точки – PAX8+ SOX9+ AMH+ клетки, белые точки – DMRT1+ SOX9+ AMH- клетки. Пунктиром показана граница семенника.

Сеть яичника – женский аналог сети семенника. Показано, что на этапе бипотенциальной гонады она развивается так же, как сеть семенника [5]. По нашим данным, сеть яичника на E12.5 и E13.5 не отличается по морфологии от сети семенника (рисунок 1.7А). Как и сеть семенника, сеть яичника экспрессирует SOX9 и PAX8. Однако

на более поздние сроки появляются различия: сеть яичника не претерпевает значительных изменений после E13.5 и остается внешне неизменной до E16.5. Интересно, что некоторые клетки сети яичника, близко расположенные к гонаде, экспрессируют FOXL2, маркер клеток гранулозы, женского аналога клеток Сертоли (рисунок 1.7Б). Но является ли этот факт свидетельством трансформации части клеток гранулозы в клетки сети яичника неясно, так как FOXL2 экспрессируют также некоторые клетки женского полового тракта, имеющие мезонефрическое происхождение.



Рисунок 1.7 - Репрезентативные фотографии эмбриональных яичников с прилежащей мезонефрической тканью на E12.5 [A) и E13.5 [Б)

Вставка 1 – увеличенное изображение фрагмента среза, обведенного пунктирной рамкой. Звездочка – антериорный полюс гонады. Точки – РАХ8+ SOХ9+ FOXL2+ клетки. Изображения получены с парафиновых срезов. Масштаб: 50 мкм [А), 25 мкм [Б, 1).

#### 1.4 Заключение

В результате нашего исследования [7] удалось детально реконструировать формирование сети семенника. Показано, что сеть семенника у мышей возникает из двух частей, дистальная, прилежащая к мезонефросу, образуется клеток, которые, вероятно, отделяются от других предшественников соматических клеток гонады довольно рано, еще до процесса детерминации пола, и экспрессия SOX9 в них инициируется по какому-то другому, не зависимому от SRY механизму. Эти клетки к E12.5 формируют утолщение между мезонефрическими трубками и гонадой на ее антериорном конце и затем вступают с ними в контакт к E13.5. Вторая часть сети (проксимальная) возникает между E13.5 и E16.5 из клеток Сертоли половых тяжей, теряющих экспрессию АМН и начинающих экспрессировать PAX8. Молекулярный механизм трансформации клеток Сертоли в клетки сети семенника пока неизвестен, но можно предположить, что одну из ключевых ролей в нем играет транскрипционный фактор PAX8. В пользу этого свидетельствуют клетки с промежуточным фенотипом AMH+/PAX8+, обнаруженные в перемычках между половыми тяжами, теряющими экспрессию AMH.

1.5 Список использованных источников

1. Nef S., Stévant I., Greenfield A. Characterizing the bipotential mammalian gonad//Current Top Development Biology. - 2019. - Vol.134. - P.167 194.

2. Cool J., DeFalco T., Capel B. Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex de novo tubulogenesis//Wiley Interdiscip Review Development Biology. - 2012. - Vol.1. - №6. P. 847 859.

3. Combes A.N., Lesieur E., Harley V.R., et al. Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development//Developmental Dynamics. -2009. - Vol. 238. - №5. - P. 1033 1041.

Nel-Themaat L., Vadakkan T.J., Wang Y., Dickinson M.E., Akiyama H., Behringer R.R. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice//Developmental Dynamics. -2009. - Vol. 238. - №5. - P. 1100 1110.

5. Omotehara T., Wu X., Kuramasu M., Itoh M. Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex-independent manner//Developmental Dynamics. - 2020. - Vol.249. - №6. - P. 754 764.

6. Malolina E.A., Kulibin A.Y. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1//Reproduction. - 2019. - Vol.158. - №5. - P. 399 413.

7. Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Formation of the rete testis during mouse embryonic development //Developmental Dynamics. – 2020. – Vol. 249. – Is. 12. – P. 1486-1499. DOI: 10.1002/dvdy.242.

## РАЗДЕЛ 2. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

#### 2.1. Введение

Серотонин и дофамин хорошо известны как классические донервные трансмиттеры, которые выполняют большое количество регуляторных функций в эмбриогенезе. Наличие функционально активных серотониновой и дофаминовой систем показано на ранних стадиях эмбрионального развития, задолго до появления первых нервных клеток, у широкого ряда видов [1]. Классическими объектами исследования донервных функций нейротрансмиттеров являются морские ежи, для ранних эмбрионов которых показана высокая чувствительность к нейрофармакологическим препаратам [2]. Описаны некоторые механизмы их действия, связанные с активностью сигнальных каскадов метаботропных и ионотропных рецепторов и влиянием на механизмы клеточного деления, межбластомерные взаимодействия, состояние цитоскелета и ресничную активность [1, 3]. Ранние эмбрионы морских ежей обладают агонистам и антагонистам чувствительностью к серотониновых, дофаминовых, адренергических рецепторов, причем эти эффекты являются специфическими, поскольку ослабляются или устраняются самими трансмиттерами или их агонистами [4]. Однако специфичность эффектов, опосредованных рецепторами, в данном случае необходимо оценивать с учетом того, что фармакологические свойства рецепторов морских ежей могут довольно существенно отличаться от таковых млекопитающих. Ранее нами показано, что на всех стадиях развития морского ежа Paracentrotus lividus от ооцита до плутеуса экспрессируется ген, гомологичный дофаминовому рецептору D2, а также несколько генов, гомологичных серотониновым рецепторам [4]. Изучены некоторые компоненты сигнальных цепей донервных трансмиттеров в ранних эмбрионах морских ежей, в частности, показано, что эти механизмы включают аденилатциклазную систему и фосфатидил-инозитольный путь, включая изменение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция [5, 6]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что различные элементы цитоскелета являются конечными звеньями этих сигнальных цепей [3, 7].

Регуляция женской репродуктивной функции на всех ее этапах является одной из универсальных в животном мире функций серотонина. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса [8], в фолликулярной жидкости [9]. В рамках Госзадания продолжается исследование роли серотонина в регуляции функциональной активности клеточных компонентов яичника млекопитающих, имеющее, наряду с фундаментальным, потенциальное прикладное значение.

#### 2.2. Материалы и методы

Работу с эмбрионами морского ежа Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816), выловленными в заливе Траште Адриатического моря, проводили в Институте биологии моря г. Котор (Черногория). Содержание морских ежей, получение гамет и проведение искусственного оплодотворения проводили в соответствии со стандартными процедурами [10]. Через 5 МИН после оплодотворения регистрировали отделение оболочки оплодотворения, в экспериментах использовали только качественный эмбриональный материал с процентом оплодотворения более 95%. Эксперименты на модели блока первого деления дробления проводили согласно описанному ранее протоколу [11]. Действующие вещества – гидрохлорид галоперидола (0931 Tocris Bioscience, США), гидрохлорид ципрогептадина (C6022 Sigma Aldrich, CША) – добавляли в необходимой концентрации через 10 мин после оплодотворения. Через 40 мин после оплодотворения производили фоторегистрацию с использованием инвертированного светового микроскопа Opton (Carl Zeiss, Германия) и цифровой окулярной насадки DCM130 (Scopetek, Китай), после чего на фотографиях, содержащих не менее 100 эмбрионов на группу, производили подсчет доли эмбрионов, завершивших деление дробления (% Clv). Для построения концентрационной зависимости проведено 8 экспериментов. Аппроксимацию экспериментальных данных и определение IC<sub>50</sub> проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США) с применением модели четырех-параметрической кривой зависимости эффекта от дозы (4PL):

 $Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\text{LogICSO} - X) * \text{HillSlope}}} [12].$ 

Зародыши, полученные в результате воздействия минимальных блокирующих концентраций, были фиксированы 4% параформальдегидом при 4°C в течение 16 ч и хранились в PBS с 0.05% азидом натрия до последующего иммуноцитохимического анализа. Фибриллярный актин окрашивали фаллоидином, конъюгированным с Alexa Fluor 546 Invitrogen, США), микротрубочки выявляли иммуноокрашиванием (A12380 с использованием мышиных моноклональных антител против тубулина (T6793 Sigma-Aldrich, США) и козьих антител против мышиных иммуноглобулинов, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (ab150113 Abcam, Великобритания), а ДНК окрашивали красителем Hoechst 33342 (40046 Biotium, США). Полученные препараты заключали в среду Fluoroshield (ab104135 Abcam, Великобритания) и просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV10i. Срединные оптические срезы, полученные при одинаковых параметрах интенсивности облучения и чувствительности детектора, использовали для анализа состояния выявленных компонентов цитоскелета с применением программного пакета Fiji [13]. Количественная оценка распределения фибриллярного актина вдоль радиальной оси бластомеров проводилась по всей окружности клетки с помощью плагина Clock Scan [14], каждый график получен при усреднении значений, полученных на 10 эмбрионах. Статистическую обработку всех данных проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США).

Для исследования влияния серотонина и флуоксетина на функциональное состояние компонентов овариального фолликула в условиях органотипической культуры яичников, каждый яичник, выделенный из 14-дневных самок мышей линии C57BL/6, разрезали на 8 фрагментов и культивировали в течение 48 ч в среде DMEM/F-12 с добавлением глутамина (3 мМ), инсулин-трансферрин-селеновой добавки, ФСГ (0,1 МЕ/мл), пенициллина (100 ЕА/мл) и стрептомицина (0,1 мг/мл), а также тестируемых веществ, на культуральных мембранах с порами 3 мкм, в условиях поверхностной пленки. В качестве действующих веществ в экспериментальных группах к фрагментам ткани яичника добавляли креатининсульфат серотонина (Sigma-Aldrich H7752) в концентрации 1 мкМ, детектируемой в фолликулярной жидкости человека [9], и гидрохлорид флуоксетина (Sigma-Aldrich F132) в концентрации 10 мкМ, которая является минимальной действующей в экспериментах на преимплантационных эмбрионах мыши [15]. Через 48 ч культивирования из фрагментов ткани яичника выделяли тотальную РНК, обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США) и синтезировали библиотеки кДНК. Далее проводили количественное исследование уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора Applied Biosystems<sup>™</sup> 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом ddCt с нормировкой на ген Rps18, стабильность экспрессии которого в овариальной ткани показана нами ранее [16]. Эксперимент проведен в четырех повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США) с применением t-критерия Вилкоксона.

В связи с часто возникающими вопросами о стабильности серотонина в водной среде, для определения оптимальной частоты смены культуральной среды, был проведен предварительный эксперимент по выявлению времени жизни серотонина в условиях культивирования ткани яичника *in vitro*. Для этого провели культивирование вышеописанной среды с добавлением 1 мкМ креатининсульфата серотонина (Sigma-Aldrich H7752) с фрагментами яичника в лунке или без них. Среду собирали через 0, 2, 15 и 24 ч после начала культивирования и измеряли концентрацию серотонина методом HPLC с электрохимической детекцией.

#### 2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1. Влияние антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов на состояние актинового и тубулинового цитоскелета эмбриона морского ежа.

В отчетный период исследовано влияние антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов на состояние актинового и тубулинового цитоскелета на модели блокады первого деления дробления морского ежа, позволяющей количественно оценить эффекты эмбриотоксических [11]. Результаты веществ работы опубликованы журнале В "Биологические мембраны" [17]. Получены данные, уточняющие зависимость эффектов галоперидола и ципрогептадина от концентрации, продемонстрированную в предыдущих работах [4]. На рисунке 2.1 представлены графики зависимости эффекта от концентрации антагонистов в диапазоне от 10 до 100 мкМ, полученные с применением модели четырехпараметрической кривой зависимости эффекта от дозы [18]. Статистически значимый эффект антагониста D2-подобных рецепторов галоперидола проявляется при концентрации 25 мкМ и составляет в среднем 27.1% дробящихся зародышей. При этом, согласно модели, IC<sub>50</sub> для галоперидола составляет 21.14 мкМ. Минимальная концентрация антагониста серотониновых рецепторов 2-го типа ципрогептадина, вызывающая статистически значимый эффект, составляет 75 мкМ (средний процент дробления 32.9%), тогда как IC<sub>50</sub> равна 59.99 мкМ. Установленные минимальные действующие концентрации исследуемых антагонистов согласуются с ранее полученными данными [4] и были использованы в последующих экспериментах. Следует отметить, что чувствительность зародышей к антагонисту дофаминовых рецепторов галоперидолу оказалась почти в 3 раза выше, чем к антагонисту рецепторов серотонина ципрогептадину.



Рисунок 2.1 - Концентрационная зависимость эффектов галоперидола (*a*) и ципрогептадина (б) на модели блока первого деления дробления морского ежа *P. lividus* 

% Clv – доля эмбрионов, завершивших первое деление дробления. М±SEM, \* – p < 0.05 по критерию Данна. Пунктиром обозначена IC<sub>50</sub>.

Для выявления механизмов цитостатического воздействия антагонистов мембранных трансмиттерных рецепторов были проведены повторные эксперименты по воздействию минимальных блокирующих концентраций дофамина и ципрогептадина на дробящиеся зародыши с последующим иммуноцитохимическим исследованием состояния цитоскелета. Галоперидол в концентрации 25 мкМ вызывает блокаду делений дробления (рисунок 2.2 e). В таких зародышах наблюдается некоторое увеличение толщины кортикального актинового цитоскелета и появление в цитоплазме гранул полимеризованного актина (рисунок 2.2 u,  $\kappa$ ). Количественная оценка распределения актина по радиальной оси зародыша (рисунок 2.3 a) показала, что при воздействии галоперидола происходит достоверное увеличение количества фибриллярного актина как в составе цитокортекса (рисунок 2.3 a), так и в цитоплазме (рисунок 2.3 z). Наблюдаемый эффект согласуется с литературными данными о влиянии трансмиттеров на цитоскелет зародышей морских ежей, из которых следует, что дофамин и антагонисты серотониновых рецепторов уменьшают, а серотонин и антагонисты дофаминовых рецепторов увеличивают жесткость кортикального слоя зигот морских ежей [3, 7].



Рисунок 2.2 - Влияние галоперидола и ципрогептадина на цитоскелет дробящихся зародышей морского ежа *P. Lividus* 

Оптическая микроскопия (*a*, *e*, *n*), фазово-контрастная микроскопия, совмещенная с инвертированным флуоресцентным окрашиванием ДНК (*б*, *ж*, *м*), иммунофлуоресценция тубулинового цитоскелета (*в*, *з*, *н*), флуоресцентное мечение F-актина (*г*, *д*, *u*, *к*, *o*, *n*). Контроль (*a*-*d*), галоперидол 25 мкМ (*e*-*к*), ципрогептадин 75 мкМ (*л*-*n*).

Эти факты свидетельствуют о негативном влиянии D2-подобного рецептора на полимеризацию актина и механические параметры цитокортекса, играющие важную роль в процессе дробления. При иммуногистохимическом окрашивании микротрубочек в зародышах, инкубированных в галоперидоле, выявляются значительные нарушения организации тубулинового цитоскелета – отсутствие периферических микротрубочек, асимметричное митотическое веретено (рисунок 2.2 *з*), а также нарушение расхождения хромосом, приводящее к появлению микроядер (рисунок 2.2 *ж*). Полученные данные свидетельствуют о возможной роли D2-подобного рецептора в поддержании правильной организации структур митотического веретена у дробящихся зародышей морского ежа.





Изменение распределения фибриллярного актина вдоль радиальной оси зародышей, инкубированных в присутствии ципрогептадина (*a*) и галоперидола (*б*). Количественная оценка степени полимеризации актина в составе цитокортекса (*в*) и в цитоплазме (*г*). М±SEM, \* - p < 0.05 по критерию Манна-Уитни.

При воздействии ципрогептадина в концентрации 75 мкМ на зиготы морского ежа происходит блокада первого деления дробления (рисунок 2.2 л). В таких зародышах наблюдается появление в цитоплазме гранул и многочисленных хаотично ориентированных коротких актиновых филаментов (рисунок 2.2 *о*, *n*). Анализ распределения фибриллярного

актина вдоль радиальной оси зародыша (рисунок 2.3 б) выявил достоверное увеличение степени полимеризации актина как в цитоплазме (рисунок 2.3 c), так и в кортикальном слое (рисунок 2.3 c). Общее содержание выявленного иммуногистохимически тубулина у интактных и обработанных ципрогептадином зародышей не отличается. В то же время тубулиновый цитоскелет в зародышах, инкубированных с ципрогептадином, полностью деполимеризован (рисунок 2.2 h). Кроме того, в зародышах отсутствуют признаки кариотомии (рисунок 2.2 h), что свидетельствует о критическом воздействии ципрогептадина на самые ранние фазы первого клеточного цикла.

Таким образом, получены данные, свидетельствующие о том, что цитостатический эффект антагонистов рецепторов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морского ежа связан с влиянием на элементы цитоскелета. Оба антагониста вызывают увеличение степени полимеризации актинового цитоскелета, причем эффект наблюдается как в кортикальном слое, так и в цитоплазме. Кроме того, оба антагониста влияют на тубулиновый цитоскелет, причем если галоперидол преимущественно вызывает нарушения пространственной организации веретена деления, то ципрогептадин приводит к полной деполимеризации тубулина и прекращению митотических процессов.

Анализ концентрационной зависимости цитостатического эффекта антагонистов показал, что зародыши морского ежа почти в 3 раза более чувствительны к антагонисту D2 рецепторов галоперидолу, чем к антагонисту рецепторов серотонина 5HT<sub>2</sub> ципрогептадину. В опубликованных ранее работах показано, что цитостатический эффект используемых веществ ослабляется в присутствии самих трансмиттеров, причем эффективность дофамина, серотонина и адреналина, а также их липофильных аналогов сопоставима [4]. В нашей работе мы не выявили эффектов самих трансмиттеров на деления дробления и состояние цитоскелета. При этом ципрогептадин и галоперидол влияют на состояние микрофиламентов сходным образом, что говорит о возможных перекрестных механизмах серотонин- и дофаминергических сигнальных путей в регуляции ранних стадий развития. Одним из вероятных ключевых звеньев в этих процессах является метаботропный рецептор, гомологичный D2-рецептору, экспрессия которого показана на ранних стадиях развития P. lividus начиная с зиготы [4]. Различное влияние галоперидола и ципрогептадина на состояние тубулинового цитоскелета, по всей вероятности, связано с различиями механизмов трансдукции сигнала, запускаемых D2-подобными и 5-НТ2-подобными рецепторами. В первом случае при воздействии антагониста происходит активация цАМФ-сигнального каскада. Известно, что галоперидол способен выступать в качестве дезорганизатора

31

тубулинового цитоскелета, воздействуя на активность киназ РКА и Akt [19] и эффекторные белки Tau [20], Aurora A [21] и KSP/Eg5 [22]. В случае же ципрогептадина происходит блок РКС-сигнального каскада, также играющего важную роль в стабилизации как актинового, так и тубулинового цитоскелета [23]. По всей вероятности, цитостатическое действие антагонистов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морских ежей основано на сходных и/или пересекающихся молекулярных механизмах, которые требуют дальнейших исследований.

2.3.2. Влияние серотонина и флуоксетина на функциональное состояние компонентов овариального фолликула.

В 2020 году подолжены исследования влияния серотонина и флуоксетина на состояние функциональное компонентов овариального фолликула в условиях органотипической культуры яичников. Для выяснения роли внефолликулярных компонентов яичника (в первую очередь, клеток стромы, в том числе клеток теки) в опосредовании эффектов серотонина на функциональную активность клеток гранулезы, проведены эксперименты на органотипической культуре яичников, полученных из 14 дневных самок. Ранее нами показано, что на данный срок постнатального развития приходится пик экспрессии главной мишени СИОЗС, транспортера серотонина Sert, что совпадает по времени с первой волной фолликуллярного роста в яичнике мыши [24]. В отдельном эксперименте установлено (рисунок 2.4 Е), что время полужизни серотонина в условиях лежит между 15 и 24 часами. При этом если в среде концентрация серотонина снижается постепенно, то в присутствии ткани яичника его концентрация довольно резко снижается за первые 2 ч культивирования, что связано, по всей вероятности с активностью системы захвата серотонина в яичнике. На основе полученных результатов принято решение о смене среды каждые 12 ч для поддержания его концентрации не менее 0,5 мкМ.

Как серотонин, так и флуоксетин не влияют на экспрессию маркеров пролиферации (*Mki67*, *Pcna*) и апоптоза (*Bax*, *Bad*, *Bcl2*, *Casp3*, *P53* и *Foxo3*). В отличие от результатов на культуре, в ткани яичника также не выявлено значимых изменений уровня экспрессии генов циклинов (*Ccna1*, *Ccnb1*, *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*), что, однако, может быть связано с анализом экспрессии в цельной ткани яичника, содержащей ряд разнообразных типов клеток, что может сглаживать эффект серотонина, оказываемый на клетки гранулезы. При анализе экспрессии маркеров стероидогенеза, не выявлено значимых изменений экспрессии генов *Cyp11a1*, *Cyp17a1* и *Star*. При этом наблюдается статистически значимое увеличение экспрессии гена ароматазы (*Cyp19a1*) в 11,2 раз при добавлении серотонина и достоверное

уменьшение экспрессии этого гена в 2,8 раз при добавлении флуоксетина. Ген Сур19а1 экспрессируется в клетках гранулезы, однако данный эффект не наблюдался в экспериментах на культуре клеток гранулезы и изолированных овариальных фолликулов. Полученный результат говорит о том, что эффект серотонина на экспрессию ароматазы реализуется при компонентов ткани участии внефолликулярных яичника. Однако, ген Cypl7al, экспрессирующийся в клетках теки и кодирующий фермент синтеза андрогенов, являющихся субстратом ароматазы, не изменяет уровень экспрессии в ответ на добавление серотонина или флуоксетина. Это существенно отличает наблюдаемые эффекты от влияния СИОЗС на функциональную активность семенников, связанных с влиянием на синтез андрогенов клетками Лейдига [25]. По всей видимости, данный эффект серотонина в яичнике опосредуется влиянием не на клетки теки, а на иные компоненты стромы яичника. Важно отметить, что выявленный эффект серотонина Sert-зависимый, более того, флуоксетин сам по себе снижает экспрессию ароматазы в ткани яичника. При этом выявленные эффекты реализуются локально на органном уровне и не зависят от системных гуморальных механизмов.





состояния овариальных фолликулов в органотипической культуре ткани яичника Маркеры пролиферации и клеточного цикла (А), апоптоза (Б), стероидогенеза (В), функционального состояния клеток гранулезы (Г), ооцитарных факторов роста (Д). NRQ – нормированная на контрольную пробу относительная экспрессия гена, в качестве референсного гена использовали *Rps18*. \* - р < 0.05 по t-критерию Вилкоксона. (Е) Анализ стабильности серотонина в культуральной среде – чистой (Среда) и с овариальной тканью (Среда с тканью). В начале инкубации в среду добавили серотонин в концентрации 1 мкМ.

Концентрацию серотонина измеряли методом HPLC с электрохимической детекцией. М±SEM. Пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий половине исходной концентрации серотонина.

При анализе маркеров функционального состояния клеток гранулезы выявлено, что уровень экспрессии гена циклооксигеназы Ptgs2, являющейся ключевым ферментом синтеза простогландинов, статистически значимо увеличивается в ответ на серотонин в 10,6 раз, а уровень экспрессии гена белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста, Igfbp4 увеличивается в 4,1 раз при добавлении серотонина и уменьшается в 2,2 раза при добавлении флуоксетина. Для генов Has2, Ptgfr и Ihh не выявлено значимых изменений экспрессии, однако заметна тенденция к росту их экспрессии в ответ на серотонин. Выявленные эффекты, в общем и целом, согласуются с полученными на других моделях результатами. Серетонин имеет явно прослеживаемый эффект усиления генов, являющихся маркерами зрелости клеток гранулезы. Ключевыми генами в этом небольшом списке являются ген гиалуронансинтазы Has2, ответственной за синтез компонентов межклеточного матрикса, необходимых для процесса экспансии кумулюса, и циклооксигеназы Ptgs2, которая ответственна за синтез простагландинов E2 и F2 в созревающем овариальном фолликуле, являющихся важнейшими регуляторами функции яичника и необходимые для процесса овуляции [26].

Экспрессия ооцитарных факторов роста *Gdf9*, *Bmp15*, *Bmp6*, *Igf1* не изменяется значимо при добавлении серотонина и флуоксетина. Однако, стоит отметить, что *Gdf9* и в этом эксперименте увеличивает уровень экспрессии в 4,2 раза, хотя полученный результат статистически не значим (p = 0,0625). Возможно, такой результат с постановкой эксперимента и выделением тотальной РНК из целого яичника, что могло привести к сглаживанию эффекта. Однако мы вынуждены были провести анализ таким образом, ввиду ограниченных материальных, трудовых и временных ресурсов.

При сопоставлении полученных результатов с предшествующими экспериментами можно заключить, что нами выявлены локальные, на уровне яичника, эффекты серотонина на экспрессию ряда генов, которые в значительном большинстве случаев отменяются флуоксетином, а значит, зависят от активности Sert. В частности, выявлен Sert-зависимый эффект серотонина на экспрессию *Cyp19a1*, *Ptgs2* и *Igfbp4* в ткани яичника. Этот результат согласуется с известными литературными данными о снижении концентрации эстрадиола в крови мышей, нокаутных по гену *Sert* и при приеме селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [27]. По всей вероятности, серотонин регулирует экспрессию ароматазы в

клетках гранулезы, причем данный эффект опосредован активностью Sert и реализуется с участием внефолликулярных компонентов яичника.

#### 2.4 Заключение

Исследовано влияние антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов на состояние актинового и тубулинового цитоскелета на модели блокады первого деления дробления морского ежа. Установлены минимальные действующие концентрации исследуемых антагонистов и выявлено, что чувствительность зародышей к антагонисту дофаминовых рецепторов галоперидолу почти в 3 раза выше, чем к антагонисту рецепторов Получены данные, серотонина ципрогептадину. свидетельствующие о том, что цитостатический эффект антагонистов рецепторов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морского ежа связан с влиянием на элементы цитоскелета. Оба антагониста вызывают увеличение степени полимеризации актинового цитоскелета, причем эффект наблюдается как в кортикальном слое, так и в цитоплазме. Кроме того, оба антагониста влияют на тубулиновый цитоскелет, причем если галоперидол преимущественно вызывает нарушения пространственной организации веретена деления, то ципрогептадин приводит к полной деполимеризации тубулина и прекращению митотических процессов. По всей вероятности, цитостатическое действие антагонистов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морских ежей основано на сходных и/или пересекающихся молекулярных механизмах, которые требуют дальнейших исследований. При исследовании влияния серотонина и флуоксетина на функциональное состояние компонентов овариального фолликула в условиях органотипической культуры яичников выявлены локальные, на уровне яичника, эффекты серотонина на экспрессию ряда генов, в том числе Sert-зависимый эффект серотонина на экспрессию Cyp19a1, Ptgs2 и Igfbp4. По всей вероятности, серотонин регулирует экспрессию ароматазы в клетках гранулезы, причем данный эффект опосредован активностью Sert и реализуется с участием внефолликулярных компонентов яичника.

### 2.5 Список использованных источников

1. Бузников Г.А. 1987. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука. 232 с.

2. Buznikov G.A., Nikitina L.A., Rakić L.M., Milosević I., Bezuglov V.V., Lauder J.M., Slotkin T.A. The sea urchin embryo, an invertebrate model for mammalian developmental neurotoxicity, reveals multiple neurotransmitter mechanisms for effects of chlorpyrifos: therapeutic interventions and a comparison with the monoamine depleter, reserpine//Brain Res. Bull. - 2007. - Vol. 74,  $N_{\odot}$  4. P. 221 - 231.

3. Бузников Г.А., Григорьев Н.К. Эффект биогенных моноаминов и их антагонистов на кортикальный цитоплазматический слой у ранних зародышей морских ежей//Журн. эвол. биохим. и физиол. - 1990. - Vol. 26. Р. 614 - 622.

4. Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić L., Bezuglov V.V., Shmukler Y.B. Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development//Zygote. - 2016. - Vol. 24. P. 206 - 218.

5. Buznikov G.A., Marshak T.L., Malchenko L.A., Nikitina L.A., Shmukler Yu.B., Buznikov A.G., Rakic Lj., Whitaker M.J. Serotonin and acetylcholine modulate the sensitivity of early sea urchin embryos to protein kinase C activators//Comp. Biochem. Physiol. - 1998. - Vol. 120A, № 2. P. 457 - 462.

6. Shmukler Yu.B., Buznikov G.A., Whitaker M.J. Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium level in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus*//Int. J. Dev. Biol. - 1999.
- Vol. 42, № 3. P. 179 - 182.

7. Григорьев Н.Г. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансмиттеров//Журн. эвол. биохим. и физиол. - 1988. - Vol. 24, № 5. Р. 625 - 629.

8. 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.

9. 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.

 Бузников Г.А., Подмарев В.И. Морские ежи Strongylocentrotus drobachiensis, S. nudus, S. intermedius. В кн.: Объекты биологии развития. Ред. Детлаф Т.А. М.: Наука, 1975.
 С. 188 - 216.

Григорьев Н.Г., Шмуклер Ю.Б. О роли ионных градиентов клеточной мембраны в раннем развитии зародышей морских ежей//Докл. АН СССР. - 1984. - Vol. 274, №
 Р. 464 - 466.

12. Bindslev N. Drug-Acceptor Interactions. London: CRC Press. 2017. - 428 p.

13. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis//Nat. Methods. - 2012. - Vol. 9, № 7. P. 676 - 682.
14. Dobretsov M. Petkau G., Hayar A., Petkau E. Clock scan protocol for image analysis: ImageJ plugins//J. Vis. Exp. - 2017. - Vol. 124. P. e55819.

15. Kim C.-W., Choe C., Kim E.-J., Lee J.-I., Yoon S.-Y., Cho Y.-W., Kang D. Dual effects of fluoxetine on mouse early embryonic development//Toxicology and Applied Pharmacology. - 2012. - Vol. 265, № 1. P. 61 - 72.

16. Nikishin D.A., Filatov M.A., Kiseleva M.V., Bagaeva T.S., Konduktorova V.V., Khramova Y.V., Semenova M.L. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot//Journal of Assisted Reproduction and Genetics. - 2018. - Vol. 35, N 10. P. 1851 - 1860.

17. Nikishin D.A., Malchenko L.A., Milosevic I., Rakic L., Shmukler Y.B. Effects of Haloperidol and Cyproheptadine on the Cytoskeleton of the Sea Urchin Embryos//Biologicheskie Membrany. – 2020. – T. 37. – N2. – C. 120-125.

18. Giraldo J., Vivas N.M., Vila E., Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models//Pharmacol. Ther. - 2002. - Vol. 95, № 1. P. 21 - 45.

19. Bowling H., Santini E. Unlocking the molecular mechanisms of antipsychotics – a new frontier for discovery//Swiss Med. Wkly. - 2016. - Vol. 146. P. w14314.

20. Liu X., Shi Y., Woods K.W., Hessler P., Kroeger P., Wilsbacher J., Wang J., Wang J.Y., Li C., Li Q., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Luo Y. Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating Aurora A kinase expression//Neoplasia. - 2008. - Vol. 10, № 8. P. 828 - 837.

21. Benítez-King G., Ortíz-López L., Jiménez-Rubio G., Ramírez-Rodríguez G. Haloperidol causes cytoskeletal collapse in N1E-115 cells through tau hyperphosphorylation induced by oxidative stress: Implications for neurodevelopment//Eur. J. Pharmacol. - 2010. - Vol. 644, № 1-3. P. 24 - 31.

22. Lee M.S., Johansen L., Zhang Y., Wilson A., Keegan M., Avery W., Elliott P., Borisy A.A., Keith C.T. The novel combination of chlorpromazine and pentamidine exerts synergistic antiproliferative effects through dual mitotic action//Cancer Res. - 2007. - Vol. 67, № 23. P. 11359 - 11367.

23. Callender J.A., Newton A.C. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later//Neuronal Signal. - 2017. - № 1. P. NS20160005.

24. 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.

25. Monteiro Filho W. O., Torres S. M. de, Amorim M. J. A. A. L., Andrade A. J. M., Morais R. N. de, Tenorio B. M., Silva Junior V. A. da. Fluoxetine induces changes in the testicle and testosterone in adult male rats exposed via placenta and lactation//Systems Biology in Reproductive Medicine. - 2014. - Vol. 60, № 5. P. 274 - 281.

26. Lindner H. R, Zor U., Kohen F., Bauminger S., Amsterdam A., Lahav M., Salomon Y. Significance of prostaglandins in the regulation of cyclic events in the ovary and uterus//Adv Prostaglandin Thromboxane Res. - 1980. - Vol. 8. P. 1371 - 1390.

27. Zha W., Ho H. T. B., Hu T., Hebert M. F., Wang J. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance//Scientific Reports. - 2017. - Vol. 7, № 1. P. 1137.

## РАЗДЕЛ 3. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА В РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ

#### 3.1 Введение

Вопрос о том, как в ходе эволюции появились зародышевые листки и 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 базальные Metazoa. Книдарии (тип Cnidaria) входят в группу базальных Metazoa вместе с типами Porifera, Placozoa, Ctenophora, и с высокой вероятностью сохранили эволюционно первичные механизмы регуляции развития, клеточных дифференцировок, физиологических процессов. 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. В настоящее время в типе Cnidaria выделяют шесть классов: Anthozoa, Myxozoa, Scyphozoa, Staurozoa, Cubozoa и Hydrozoa.

Динамические изменения формы отдельных клеток лежат в основе многих морфогенезов, которые обеспечивают развитие эмбрионов многоклеточных животных, и в частности, ключевой процесс, во время которого формируются зародышевые листки и закладывается план строения эмбриона, - гаструляцию. Во время гаструляции очень часто встречаются два морфогенетических процесса, обусловленные изменением формы отдельных клеток: изгибание клеточных пластов (например, инвагинация) и иммиграция клеток от эпителия в процессе эпителиально-мезенхимного перехода (ЕМТ) [1]. Оба эти процесса включают преобразование формы эпителиальных клеток за счет сокращения их апикальных поверхностей [2]. На клеточном уровне такие изменения формы вызваны локальным обогащением апикального кортекса филаментарным актином и активацией миозина [3], а также модуляцией экспрессии молекул межклеточной адгезии [4]. Дифференциальная экспрессия генома в сочетании с поддержанием биомеханической обратной связи обеспечивают координированные изменения формы клеток. При этом экспрессия ключевых факторов транскрипции (например, Brachyury, Snail и Beta-catenin) как регулирует эти изменения, так и является ответом на них [5].

Исследования представителей типа Cnidaria очень информативны для понимания клеточных механизмов морфогенетических процессов. Их результаты могут быть использованы для сравнительного анализа развития книдарий и представителей Bilateria, а также для сравнения разных видов книдарий, которые демонстрируют высокое разнообразие

39

и эволюционную пластичность морфогенетических процессов [6]. Действительно, в гаструляции книдарий задействованы все основные морфогенезы, выделяемые в развитии Metazoa на клеточном уровне [7].

Однако большая часть имеющейся информации о развитии книдарий получена еще в XIX - начале XX века, и сведения о морфогенезах в нормальном развитию книдарий крайне фрагментарны. Для того, чтобы восполнить этот пробел, мы провели исследования морфогенезов нормального развития книдарий, принадлежащих к двум классам - Hydrozoa (*Clytia hemisphaerica*) [8] и Staurozoa (*Lucernaria quadricornis*) [9]. В нашей работе мы сосредоточились на изучении изменении формы отдельных клеток в разных регионах эмбриона и на связи этих изменений с формой эмбриона как целого и с конфигурацией поля механических напряжений. Задачи проведенного исследования были следующие: изучить эмбриональное развитие *Clytia и Lucernaria* и создать таблицы нормального развития; охарактеризовать форму клеток на последовательных стадиях развития в разных регионах эмбриона; реконструировать морфогенезы нормального развития; сопоставить гаструляционные морфогенезы изученных видов и сопоставить их с гаструляционными морфогенезами модельных видов билатерий.

## 3.2 Материалы и методы

3.2.1. Изучение морфогенезов нормального развития гидроида Clytia hemisphaerica [8].

Эмбрионы *Clytia* были получены от лабораторной линии Z [10]. Самцы и самки содержались отдельно. Гаметы собирали после индуцированного светом нереста взрослых медуз. Гаметы смешивали и оставляли на один час для оплодотворения. Эмбрионы содержались в искусственной морской воде Red Sea Salt, профильтрованной через миллипоровый фильтр (MFSW). Эмбриональное развитие протекало при температуре 18°C. Цейтраферную съемку эмбрионов выполняли с использованием инвертированных микроскопов Zeiss Axiophot-100 и Zeiss AxioObserver. Изображения DIC были получены на микроскопе Olympus BX51. На ранних стадиях эмбрионы помещали в небольшую каплю MFSW между двумя покровными стеклами, разделенными влажной прокладкой из фильтровальной бумаги и запечатывали силиконовой пастой. На стадии ранней гаструлы эмбрионы начинают плавать за счет биения ресничек, поэтому их помещали в 1,0 или 1,5% гель из агарозы с низкой температурой плавления (BioRad), приготовленый на MFSW. Это однако не предотвращает биение ресничек и эмбрионы продолжают вращаться внутри агаровой капсулы. Программу FIJI (https://imagej.net/Fiji) использовали для регулировки

40

уровня яркости отдельных оптических срезов Z-стека (функция 'bleach correction') и для преобразования видео в формат .avi, а также для измерения размеров эмбрионов.

Для сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ТЭМ) электронной микроскопии эмбрионов фиксировали в течение ночи при комнатной температуре в следующем фиксаторе: один объем 2,5% глутарового альдегида, четыре объема 0,4 М Na-какодилатного буфера (pH 7,2) и пять объемов MFSW (1120 мОсм) [11]. Затем эмбрионов переносили в раствор 1,25% глутаральдегида на 0,2 М Na-какодилатном буфере (pH 7,2) и хранили при + 4°С. Перед дальнейшей обработкой образцы постфиксировали в 1% OsO4 на 0,2M Na-какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 1 ч и промывали тем же буфером. Дальнейшую обработку проводили, как описано в Fritzenwanker et al. (2007). Образцы для СЭМ исследовали на сканирующих электронных микроскопах CamScan S-2 и JSM-6380LA. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 с камерой Gatan ES500W Model 782. Электронная микроскопия выполнялась в лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) выполняли окрашивания ядер и контуров клеток. Эмбрионов фиксировали в течение 2 часов в 4% формальдегиде на иммунобуфере (0,1 M HEPES pH 6,9, 50 мМ EGTA, 0,1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 80 мМ мальтоза, 0,2% Triton-X-100) в течение двух часов при комнатной температуре. После промывок в PBS, содержащем 0,1% тритона X100 (PBST), кортикальный слой актина окрашивался инкубацией в течение ночи при 4°С в родамин-фаллоидине 1:100 (исходный раствор в метаноле; Fisher Scientific # 10125092). Для окрашивания TUNEL с использованием "In Situ Cell Death Detection Kit TMR" (Roche # 12156792910) эмбрионы фиксировали в течение четырех часов в 4% формальдегиде на иммунобуфере. Затем образцы последовательно обрабатывали метанолом (4°С от 2 часов до нескольких дней); 0,2% Triton X-100 в 0,1% цитрате натрия pH 6,0 (30 минут при комнатной температуре); протеиназой К (1/25 исходного раствора из набора для анализа Click-iT ™ Plus TUNEL - Molecular Probes # С10617) 30 минут при комнатной температуре. После каждой обработки эмбрионы промывали два или более раз в PBST. Мечение TUNEL выполняли в 1,5 мл эппендорфах, содержащих примерно по 30 эмбрионов в 30-40 мкл PBS, к которым добавляли 84 мкл реакционной смеси, содержащей 72 мкл Labelling solution и 12 мкл Enzyme solution из набора Roche. После перемешивания пробирки инкубировали 2 часа при 37°С. На следующем шаге эмбрионы промывались PBST, ядра окрашивались 1 мкг / мл Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich #

94403). Окрашенные эмбрионы заключались в среду Citifluor AF-1. Все образцы были анализировались с помощью конфокального микроскопа Leica SP5.

Гибридизацию *in situ* проводили с использованием меченых DIG антисмысловых зондов так, как описано в [12]. Двойная гибридизация *in situ* проводилась с использованием зонда, меченного флуоресцеином (*CheBra1*) и зонда, меченного DIG (*CheSnail*). Детекция зондов осуществлялась с использованием антител, конъюгированных с пероксидазой и щелочной фосфатазой, с субстратами NBT или Fast red соответственно [13]. Все используемые последовательности и зонды были описаны в [14], за исключением *CheSnail* (номер MN657238), который мы выделили из библиотеки Expressed sequence tag (EST) [13], и *Sox10* [13].

3.2.2. Изучение морфогенезов нормального развития ставромедузы Lucernaria quadricornis [9]

Половозрелые ставромедузы были собраны в августе на Беломорской биологической станции МГУ им. Перцова (ББС МГУ) (Кандалакшский залив, Белое море, Россия, 66°34′ с.ш., 33°08′ в.д.). Собранных животных содержали при 8 ° С в NSW и кормили только что вылупившимися науплиями *Artemia salina* один раз в день. После спонтанного нереста зиготы переносили в чашки Петри с MFSW и содерживали при 8° С в течение всего дальнейшего развития.

Изображение эмбрионов *in vivo* получали каждые 4-5 часов с помощью светового микроскопа (Leica DM2500; Leica Microsystems, Wetzlar, Германия) со встроенной цифровой камерой 10MP.

Флуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия. Эмбрионы и личинки фиксировали в свежеприготовленном 4% параформальдегиде (Fluka, Германия) на 0,1 М фосфатном буфере (PBS, pH 7,4; Fluka, Германия) в течение ночи при 4°С. Начиная со стадии удлинения тела, все эмбрионы перед фиксацией инкубировались в 0,7 М MgCl2. После пермеабилизации PBST, образцы инкубировали в мышиных антителах против ацетилированного альфа-тубулина, разведенных 1: 2000 (Sigma, CША) в PBST при 4°С в течение 24 часов. После промывания в PBST, эмбрионы инкубировались в смеси козьих антимышиных антител (1:500; Molecular Probes, США), конъюгированных с Alexa 647, фаллацидина-Bodipi (1:200; Thermo Fisher Scientific, США) и пропидия йодида (10 мкг/мл.; Sigma-Aldrich, США) или DAPI (1 мкг/мл; Molecular Probes, США) в PBST. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 3-4 часов. После промывки в PBS образцы

помещали в смесь 30% глицерина/PBS, а затем постепенно повышали содержание глицерина, и, наконец, заключали в 70% глицерин.

Изображения были получены на Nikon A1 КЛСМ (Nikon Instruments, Япония). Оптические срезы сканировались с шагом 1 мкм. Полученные z-стеки экспортировались в ImageJ 2.0.0 (NIH, США), где были получены проекции максимальной интенсивности и регулировались яркость и контрастность изображений.

Подсчет клеток проводился для каждой стадии развития по крайней мере у пяти эмбрионов с использованием программы ImageJ. Ядерные красители не метили ядра до окончания гаструляции. Следовательно, количество клеток подсчитывали только на основании окрашивания фаллацидином; как фаллацидин, так и ядерное окрашивание использовали для подсчета клеток на постгаструляционных стадиях.

ТЭМ выполняли, как описано ранее. [15]. Поскольку эмбрионы слипаются друг с другом, их обрабатывали небольшими группами. Планулы обрабатывали индивидуально.

### 3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1. Изучение морфогенезов нормального развития гидроида Clytia hemisphaerica.

Clytia демонстрирует «типичный» для класса Hydrozoa сложный жизненный цикл: взрослая стадия (медуза) бесполым путем формируется на колонии полипов. Медуза выбрасывает в воду гаметы; в воде происходит оплодотворение и эмбриональное развитие до стадии личинки планулы. Планула через несколько дней оседает и превращается в первичный полип, который является основателем новой колонии [16]. Первые исследования эмбрионального развития этого вида относятся к XIX веку, когда была описана гаструляция путем иммиграции клеток презумптивной эндодермы с одного из полюсов эмбриона (C. flavidula = C. hemisphaerica) [17]. Молекулярные исследования развития C. hemisphaerica показали, что иммиграция клеток происходит в пределах орального домена, формирующегося на стадии бластулы под действием материнских иРНК, которые запускают активацию канонического сигнального каскада Wnt.

Морфогенезы раннего развития Clytia были нами охарактеризованы с помощью наблюдений *in vivo*, КЛСМ, СЭМ и ТЭМ [8]. Мы описали последовательность изменений формы клеток Clytia со стадии дробления до стадии планулы в зависимости от их положения в эмбрионе [8, 19]. С помощью метода гибридизации *in situ* мы охарактеризовали паттерны экспрессии ряда генов, ортологи которых вовлечены в регуляцию гаструляционных морфогенезов высших Metazoa [8].

Основными событиями в процессе формирования личинки-планулы *Clytia* являются: дробление (рисунок 3.1 *a*); образование бластулы (рисунок 3.1 *б*); эпителизация бластодермы (рисунок 3.1 *в*; рисунок 3.2 *a*, *б*); иммиграция клеток оральной бластодермы (т.е. клеток презумптивной эндодермы) в бластоцель (рисунок 3.1 *г* -  $\mathcal{K}$ ; рисунок 3.2 *в*, *г*, *е*,  $\mathcal{K}$ ); миграция выселившихся клеток в аборальном направлении и заполнение бластоцеля (рисунок 3.1 *д* - *з*; рисунок 3.1 *а* - *г*); удлинение эмбриона и морфогенез его полюсов (рисунок 3.1  $\mathcal{K}$  - *л*); эпителизация эндодермы (рисунок 3.1 *и* - *л*; рисунок 3.5 *a* - *e*).



Рисунок 3.1 - Таблица нормального развития Clytia (а) - раннее дробление, 8 бластомеров; стрелка - контакт несестринских бластомеров; (б) - ранняя бластула, 32 бластомера, бц – бластоцель; (B) поздняя бластула, завершившая эпителизацию бластодермы; оранжевые стрелки - границы утолщенной бластодкрмы орального домена. (Г ж) Последовательные стадии гаструляции выселения клеток орального домена в бластоцель И ИХ распространение в аборальном направлении; белая стрелка аборальный миграционный (з) - паренхимула, фронт; бластоцель полностью заполнен клетками эндодермы; (и - л) -развитие планулы (л), эпителизация эндодермы, формирование гастральной полости (гц) И базальной мембраны (белые стрелки).

Через 9-10 часов после оплодотворения (hpf) бластодерма становится толще на одной стороне - происходит выделение орального домена, занимающего около трети поверхности эмбриона (рисунок 3.1 *в*, *г*). Среднее отношение территории оральной бластодермы к остальной бластодерме составляет  $2,3 \pm 0,65$ , минимум 1,5, максимум 3,5, n = 18 эмбрионов. Утолщение орального домена становится более выраженным в начале гаструляции (10-11

hpf) (рисунок 3.2 *в*, *г*). Клетки орального домена относятся к двум морфологическим типа: (1) обычные эпителиальные клетки столбчатой формы с короткими апикально-базальными осями (рисунок 3.2 *в*, *г*, *ж*, *к*); (2) клетки с удлиненными апико-базальными осями, расширенными базальными концами и сокращенными апексами (рисунок 3.2 *в*, *г*, *ж*, *к*). Морфология второго типа характерна для колбовидных клеток эмбриональных эпителиев, подвергающихся первичному эпителиально-мезенхимальному переходу EMT [1]. В пределах орального домена колбовидные клетки равномерно распределены и чередуются с обычными эпителиальными клетками (рисунок 3.2 *к*). Клетки орального домена колбовидные клетки равномерно распределены и чередуются с обычными эпителиальными клетками (рисунок 3.2 *к*). Клетки орального домена экспрессируют ортологи генов, задействованных в регуляции EMT и миграционного поведения клеток у высших Metazoa, в частности *brachyury* и *snail*. По-видимому, экспрессия этих генов активирует в клетках орального домена каскадом cWnt.



Рисунок 3.2 - Морфология и ультраструктура клеток эмбриона Clytia

(а) - поздняя бластула, КЛСМ; мк - митозы, сб - стенка бластоцеля, бц - бластоцель. (б) клетки поздней бластулы, СЭМ; а - апекс, б - базальная, лат - латеральная поверхность, стрелка - жгутик. (в, г) - ранняя гаструла (в) и её оральный домен (г), КЛСМ. Оральный домен на (в) очерчен пунктиром; фиолетовые стрелки - колбовидные клетки (КК), отдельные КК закрашены голубым. (д, е, ж) - средняя гаструла; СЭМ (д), КЛСМ (е), оральный домен (ж); двойная желтая стрелка - медиолатеральная интеркаляция клеток эндодермы, белые стрелки - аборальный фронт миграции, голубая - миграция клеток по стенке бластоцеля. (3) миграция клеток по стенке бластоцеля, СЭМ; розовая стрелка - ламелла, желтые филоподии; le - лидирующий край, te - тянущийся край. (и) - клетки "ядра", образующие слои, перпендикулярные оси эмбриона. (к) - оральный домен, СЭМ; чередование КК (фиолетовый цвет) и обычных эпителиальных клеток (желтый); клетка, завершившая ЕМТ синий цвет. (л, м) - ультраструктура КК (л) и субапикальной области КК(м); двойная стрелка - вытяжение апико-базальной оси, красная стрелка - жгутик, зеленые - субапикальные контакты, розовая - карман, в который погружается редуцирующийся жгутик; я - ядро, зв вакуоли с запасными веществами, кг - кортикальные гранулы. (н) - апексы клеток орального домена, СЭМ; в рамке - сокращающийся апекс КК (фиолетовый цвет), который частично закрыт отростками эпителиальной клетки (желтая стрелка, желтый цвет).

Мы охарактеризовали последовательные стадии ЕМТ клеток презумптивной эндодермы *Clytia*: описали ультраструктуру колбовидных клеток (например, рисунок 3.2 *л*, *м*), выделили основные стадии их формирования (схема на рисунке 3.3). Мы показали, что эпителиальные клетки, расположенные рядом с колбовидной клеткой, формируют отростки, перекрывающие сайт выселения (рисунок 3.2 *н*). Такое поведение клеток обеспечивает сохранение целостности орального эпителия и является консервативной чертой первичного ЕМТ.



Рисунок 3.3 - Схема преобразования формы клетки презумптивной эндодермы

(а - д) - ЕМТ в ходе гаструляции, (е) - мигрирующая мезенхимальная клетка, (ж) - мезенхимоэпителиальный переход, формирование эпителиальной эндодермы.

Мы также описали поведение клеток, завершивших ЕМТ и выселившихся в бластоцель (рисунки 3.2  $\varkappa$  - u; 3.4  $\delta$ ; 3.5). Эти клетки образуют три популяции: (1) «оболочка», состоящая из тесно связанных друг с другом плоских клеток, ползущих вдоль стенки бластоцеля рисунок (рисунки 3.2 s; 3.5); (2) центральная клеточная масса (или «ядро»), её клетки образуют слои, ориентированные перпендикулярно оси эмбриона (рисунки 3.2 u; 3.5); (3) менее упорядоченная популяция клеток, только что выселившихся из бластодермы в области орального полюса (рисунок 3.5). Миграционный фронт клеток "оболочки" и клеточная масса "ядра" постепенно сдвигаются в аборальном направлении, и бластоцель полностью заполняется клетками (рисунки 3.3  $\delta$ , z; 3.5).



Рисунок 3.4 - Поздняя гаструла, СЭМ (а) и КЛСМ (б); желтые стрелки на (б) - миграция клеток, голубые - клетки, мигрирующие по стенке бластоцеля. Последовательные стадии формирования планулы, СЭМ (в, ж) и КЛСМ (г - е, з); гц - гастроцель, бм - базальная мембрана, пунктирная линия очерчивает эпителиальную эндодерму, желтые стрелки - оральная граница сформированной базальной мембраны. Полностью сформированная планула показана на (ж) и (з).

Поведение клеток эндодермы *Clytia* не сводится к индивидуальной миграции. Клетки как "ядра", так и "оболочки" связаны друг с другом точечными адгезионными контактами, точно так же, как клетки мезодермы эмбрионов позвоночных, мигрирующие в виде кластера [18]. Наша компьютерная модель гаструляции *Clytia* [19] подтверждает, что форма эмбриона

определяется координированной миграцией этих клеток: почти сферическая ранняя гаструла трансформируется в грушевидную среднюю гаструлу, а затем в торпедообразную паренхимулу (рисунки 3.2 *д, e*; 3.4 *a* - *з*). Силы, генерируемые мигрирующими в аборальном направлении клетками "оболочки", вносят важный вклад в удлинение эмбриона. Клетки "ядра" интеркалируют друг с другом, выстраиваясь в слои. Силы, генерируемые их интеркаляцией, направлены ортогонально оси эмбриона и стягивают стенки бластоцеля к центру (рисунок 3.5).

Скоординированные медио-латеральная интеркаляция и аборальная миграция клеток уменьшают диаметр сначала оральной области, а затем и всего эмбриона (рисунок 3.5). Уменьшение диаметра, в свою очередь, генерирует сжимающие силы, перпендикулярные орально-аборальной оси, и способствует аборальному смещению клеток, выселившихся в бластоцель (рисунок 3.5).



Рисунок 3.5 - Схема, реконструирующая пространственное распределение клеточных морфологий, клеточных движений, а также сил и напряжений, управляющих морфогенезом

### Clytia

А - ранняя гаструла, Б - средняя гаструла, В - поздняя гаструла. На рисунках (a - d) показаны центральные срезы эмбриона (a), увеличенные срезы орального конца (b, d), поперечные срезы на уровнях, указанных стрелками (c и c '), а также реконструированные силы и напряжения (c, c', d). Пунктирные линии на рисунках с и c' указывают границу между «оболочкой» мигрирующих клеток и внутренним «ядром». Макроскопические складки бластодермы на В отмечены звездочками. Схемы Г, Д, Е иллюстрируют взаимосвязь между поведением отдельных клеток и деформацией бластодермы. Клетка «оболочки», мигрирующая по базальной поверхности бластодермы, генерирует тянущие силы, направленные противоположно миграции клетки и действующие на субстрат. Бластодерма под клеткой и за ней сминается в микроскладки (пунктирные линии), перпендикулярные направлению движения. Бластодерма перед клеткой растягивается и деформируется в радиальные морщины (сплошные линии).

Поляризованная морфология личинки планулы, включая длинную оральноаборальную ось и суженый задний (оральный) конец, проявляется ближе к концу гаструляции (рисунки 3.4 *в*; 3.5 *в*). Нарушение интеркаляции клеток "ядра" в результате нокдауна белков РСР, предотвращает уменьшение диаметра и удлинение эмбриона во время гаструляции [20]. К такому же результату привело моделирование отсутствия интеркаляции *in silico* [19].

3.3.2. Изучение морфогенезов нормального развития ставромедузы Lucernaria quadricornis.

Основные этапы развития *Lucernaria* выявлены и описаны с помощью наблюдения за живыми эмбрионами, которые проводились с помощью микроскопа каждые 1,5 - 2 часа [9]. Яйцеклетка *Lucernaria* имеет диаметр около 40 мкм (рисунок 3.6 *a*). Дробление зиготы голобластическое, равномерное, во время первых четырех делений синхронное. Между делениями дробления проходит около пяти часов. На стадии 16-ти клеток эмбрион представляет собой бластулу без полости, клетки которой имеют клиновидную форму (рисунок 3.6 *г*). Дальнейшие деления происходят асинхронно. Гаструляция начинается приблизительно через 25 hpf. Клетки презумптивной эндодермы меняют форму: они удлиняют апико-базальные оси и из клиновидных становятся столбчатыми (рисунок 3.6 *д*, *е*), а апикальные теряют контакт с поверхностью. На стадии поздней гаструлы клетки эндодермы плотно упакованы внутри сферического эмбриона (рисунок 3.6 *ж*). Морфологическая дифференцировка оси тела начинается примерно через 40 hpf. Эндодерма постепенно изменяет свою форму (это занимает 15-20 часов): сначала она становится эллипсоидальной

(рисунок 3.6 *з* -  $\kappa$ ), а затем удлиняется и изгибается (рисунок 3.6 *л*). Однако форма эмбриона все еще остается сферической. На следующем этапе (около 60 hpf) эмбрион теряет сферическую форму и постепенно удлиняет ось тела (рисунок 3.6 *м* - *o*). На третий день развития тело личинки распрямляется, и она выползает из оболочки оплодотворения (рисунок 3.6 *o*, *n*). Вскоре после вылупления длина личинки достигает 120 мкм, а диаметр 30 мкм (рисунок 3.6 *n*). Мы выделили следующие ключевые этапы раннего развития *Lucernaria*: раннее дробление, бластула, гаструляция, морфологическая дифференциация орально-аборальной оси тела, планула.



Рисунок 3.6 - Таблица нормального развития *Lucernaria* 

\_ B) дробление; **(**Г) (a \_ стереобластула; (д. е. ж) - ранняя, средняя поздняя гаструлы, И соответственно; (з, и) начало морфологической дифференцировки ОА оси тела: клетки эндодермы вытянуты перпендикулярно будущей оси; (к) - начало интеркаляции клеток эндодермы; (л) - эндодермальный стержень удлиняется в результате интеркаляции клеток и скручивается внутри сферического эмбриона; (м) выпрямление эндодермального стержня, начало пересортировки клеток эктодермы и удлинения оси тела; (н) - эндодермальные клетки завершают интеркаляцию, эмбрион приобретает форму "фасолины"; (о) выпрямление оси тела, вылупление; (п) - удлиненная личинка планула с сильно вакуолизированными клетками эндодермы через несколько

дней после вылупления.

Более детальное исследование всех стадий выполнено с помощью конфокальной и электронной микроскопии. Кроме того, мы описали динамику пролиферации клеток (рисунок 3.7). Опираясь на эти данные, мы реконструировали взаимодействия между изменением формы клеток, поведением клеток и конфигурацией поля механических напряжений у малоклеточного эмбриона *Lucernaria* во время гаструляции и морфологической дифференцировки ОА оси личинки.



Рисунок 3.7 - Динамика числа клеток в раннем развитии *Lucernaria* Среднее ± StDev.

Гаструляция у этого вида, как и у *Clytia*, основана на процессе эпителиальномезенхимального перехода клеток презумптивной эндодермы. Начальные условия, которые влияют на механику гаструляции *Lucernaria* - это небольшое количество клеток (около 20), отсутствие бластоцеля и большой размер клеток относительно размера эмбриона (рисунок 3.8  $a, \delta$ ).

Дестабилизация поля механических напряжений, которая инициирует гаструляцию, связана с сокращением апексов клеток презумптивной эндодермы (это 2 - 4 клетки) (рисунок 3.8 e). Сужение апексов происходит за счет сокращения актомиозиновой сети. Клиновидные клетки стереобластулы меняют форму на столбчатую, а затем колбовидную (рисунок 3.8 e - d). Сокращение апексов колбовидных клеток генерирует силы, растягивающие соседние клетки. Векторы этих сил направлены ортогонально к месту выселения клеток. Клетки бластодермы в ответ на растяжение меняют форму: они увеличивают площадь апексов и уплощаются, изменяя форму от клиновидной до трапециевидной (рисунок 3.8 e - d). Клетки презумптивной эктодермы, находящиеся непосредственно вокруг сайта выселения, с механической и морфологической точки зрения эквивалентны губе бластопора книдарий с инвагинационной гаструлой, таких как *Nematostella* [21]. Принципиальная разница состоит в

том, что "настоящая" губа бластопора состоит из многих клеток, согласованно меняющих форму, а роль губы бластопора у *Lucernaria* выполняет всего 4 - 5 клеток (всего 1 клетка на срезе).

Изменение формы клеток эктодермы не только стабилизирует поле механических напряжений: оно обеспечивает дополнительную поверхность, необходимую для "заживления" разрыва бластодермы в месте синхронного выселения клеток. На стадии средней гаструлы клетки "губы бластопора", формируют широкие и плоские ламеллы, которые перекрывают сайт иммиграции. Это эволюционно консервативное поведение клеток, находящихся на краю разрыва эпителия, и обнаружено в ЕМТ многих животных [1]. Точно так же ведут себя эпителиальные клетки бластодермы Clytia, которые находятся по соседству с выселяющимися колбовидными клетками (рисунок 3.8 e - d). Таким образом, гаструляция *Lucernaria*, как и гаструляция Clytia представляет собой цепочку взаимообусловленных этапов, контролируемых полем механических напряжений.

Эмбрионы *Lucernaria* заканчивают гаструляцию в механически равновесном состоянии: округлые клетки, плотно упакованные внутри эктодермальной оболочки. И эндодерма, и эктодерма имеют сферическую форму (рисунок 3.8 *е, ж*). Дальнейший морфогенез клеток эндодермы начинается, как только их число достигает 16 - 18 (рисунок 3.7). Клетки эндодермы постепенно изменяют форму от округлой до дискоидальной (рисунок 3.8 *з, и, к, м*), устанавливая контакт с базальной мембраной по всему периметру диска. Интеркаляция клеток эндодермы (рисунок 3.8 *з, и, к, м*) в конечном итоге приводит к изменению площади поверхности эндодермы и занимаемого ею объема.

Эндодермальный стержень представляет собой пружину, ограниченную жесткой оболочкой: он изогнут внутри сферической эктодермы, которая ограничивает изменение его формы (рисунок 3.8 к, л). В результате эктодермальная оболочка оказывается в состоянии механического неравновесия. Благодаря механочувствительности, клетки имеют тенденцию перемещаться таким образом, чтобы компенсировать неравновесие поля механических напряжений [22]. У эмбриона *Lucernaria* клетки эктодермы перераспределяются по поверхности эндодермального стержня. С этого момента эктодерма не ограничивает эндодермальный стержень, а повторяет его форму, и именно за счет этого тело эмбриона становится, наконец, удлиненным (рисунок 3.8 м). Дополнительным источником клеточного материала эктодермы являются митозы. Во время выстраивания эндодермальных клеток в один ряд число клеток эктодермы удваивается (рисунок 3.7). Мы предполагаем, что митозы провоцируются усиливающимся механическим неравновесием, связанным с изменением

формы презумптивной эндодермы. Таким образом, неравновесие поля механических напряжений, связанное с формированием эндодермального стержня, вызывают изменения в поведении эктодермальных клеток, что имеет решающее значение для изменения формы эмбриона. Сферический эмбрион приобретает форму фасолины, а затем червеобразной личинки планулы. Движущей силой удлинения ОА оси является морфогенез клеток эндодермы и вызываемая им дестабилизация поля механических напряжений эмбриона.



Рисунок 3.8 - Основные этапы преобразования формы клеток эмбриона *Lucernaria*, КЛСМ (а, б) – стереобластула; (в - д) - гаструляция; желтая стрелка - КК, сокращающая апекс, красная - столбчатая КК; (е, ж) – гаструла; (з, и) - клетки эндодермы выстроены в 2 ряда вдоль формирующейся оси тела; (к, л) - сферический эмбрион, клетки эндодерма уже выстроена в один ряд; (м, н) - удлинение орально-аборальной оси, перераспределение и пролиферация клеток эктодермы; (к, м) - оптические срезы; (л, н) - -z-стеки.

Мы выявили сходство процессов развития у ставромедуз и филогенетически далеких от них билатерий с низким числом клеток у эмбрионов (нематоды, гастротрихи, некоторые моллюски, некоторые асцидии). У таких животных конвергентно эволюционировали сходные морфогенетические процессы. С какими ограничениями сталкиваются эмбрионы видов, эволюционирующих в сторону низкого числа клеток? Во-первых, это очень небольшой набор доступных такому виду морфогенетических процессов. Если мы проанализируем набор морфогенетических движений, доступных для книдарий (Hydrozoa, Scyphozoa и Staurozoa), мы обнаружим, что некоторые морфогенезы не доступны для Staurozoa "по умолчанию", поскольку они основаны на согласованном поведении многих клеток. К таким морфогенезам относятся инвагинация, которая характерна для сцифоидов, и иммиграция множества клеток, что характерно для гидроидов.

Еще одно ограничение, которое могло повлиять на развитие животных, эволюционирующих в сторону уменьшения количества клеток у эмбрионов и личинок, - это низкий порог механической нестабильности, который может снизить устойчивость развития. У эмбрионов с большим количеством клеток (например, у земноводных) изменения формы и механического состояния отдельных клеток влияют на механическое состояние и изменение формы тканей только в том случае, если они происходят у многих клеток одновременно. У эмбриона *Lucernaria* каждая отдельная клетка составляет настолько большую часть эмбриона, что изменение её формы немедленно приводит к изменению механического состояния всего организма и может вызвать драматические последствия для развития. Мы можем найти очень похожую ситуацию у эмбриона асцидий, где губа бластопора (на срезе) состоит всего из одной клетки, которая выполняет почти ту же работу, что и многоклеточная губа бластопора у эмбрионов позвоночных [3]. Следовательно, эмбрионы с низким числом клеток в ходе эволюции «должны были научиться», как обеспечивать устойчивость развития при повышении морфогенетической роли каждой отдельной клетки.

## 3.4 Заключение

В 2020 году было выполнено изучение морфогенезов нормального развития двух видов книдарий, эмбрионы которых различаются числом клеток. Оба вида формируют эндодерму с помощью униполярной иммиграции - морфогенеза, в ходе которого клетки презумптивной эндодермы подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу (ЕМТ) и выселяются в бластоцель. Такой морфогенез используют как эмбрионы, состоящие к началу гаструляции больше чем из 1000 клеток (*Clytia*) [8, 19], так и эмбрионы всего из 16 - 32х клеток (*Lucernaria*) [9]. Сравнительный анализ показывает, что основные черты

эмбриональных ЕМТ являются общими для представителей разных классов типа Cnidaria, а также для представителей Bilateria. Вероятно, эти общие черты могут быть прослежены до корней филогенетического дерева Metazoa.

Для изученных видов книдарий мы реконструировали обратную связь между изменением формы клеток, их поведением, и формой эмбриона. Наше исследование показывает, что иммиграция клеток не только обеспечивает материал для формирования эндодермального зародышевого слоя. Клетки презумптивной эндодермы генерирует силы, которые меняют форму эмбриона в процессе гаструляции и морфологической дифференцировки орально-аборальной (передне-задней) оси личинки [8, 9]. Мы показали, что гаструляция и морфологическая дифференцировка орально-аборальной оси тела у Lucernaria И Clytia представляет собой цепочку взаимообусловленных этапов, контролируемых полем механических напряжений. Мы подтвердили, что "глобальный контроль" морфогенетических процессов полем механических напряжений - один из наиболее консервативных и древних способов поддержания устойчивости развивающейся системы [8, 9, 19].

#### 3.5 Список использованных источников

1. Shook D.R., Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development // Mechanisms of Development. -2003. - Vol. 120. - №11. - P. 1351–1383.

2. Sawyer J. M., Harrell J. R., Shemer G., et al. Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis // Developmental Biology. - 2010. - Vol. 341. - №1. - P. 5–19.

3. Sherrard K., Robin F., Lemaire P., Munro E. Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination // Current Biology. - 2010. - Vol. 20. - №17. - P.1499-1510.

4. Lecuit T., Yap A. S. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics // Nature Cell Biology. - 2015. - Vol. 17. - №5. - P. 533–539.

5. Pukhlyakova E., Aman A. J., Elsayad K., Technau U. β-Catenin–dependent mechanotransduction dates back to the common ancestor of Cnidaria and Bilateria // PNAS. - 2018.
- Vol. 115. - №24. - P. 6231–6236.

6. Краус Ю.А., Марков А.В. Гаструляция книдарий: ключ к пониманию филогенеза или хаос вторичных модификаций // Журнал общей биологии. - 2016. - Т. 77. - № 2. - С. 83-105.

7. Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565

8. Kraus Yu., Chevalier S., Houliston E. Cell shape changes during larval body plan development in *Clytia hemisphaerica* // Developmental Biology. - 2020. - Vol. 468. - P. 59–79.

c.

9. Mayorova T.D., Osadchenko B., Kraus Y. How to build a larval body with less than a hundred cells? Insights from the early development of a stalked jellyfish (Staurozoa, Cnidaria) // Organisms Diversity & Evolution. - 2020. - Vol. 20. - P. 681–699.

10. Leclere L., Horin C., Chevalier S., et al. The genome of the jellyfish Clytia hemisphaerica and the evolution of the cnidarian life-cycle // Nature Ecology & Evolution. - 2019. - V. 3. -  $N_{2}5$ . - P. 801–810.

11. Ereskovsky A.V., Tokina D.B., Bezac C., Boury-Esnault N. Metamorphosis of cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera) // Journal of Morphology. - 2007. - Vol. 268. - №6. - P. 518-528.

12. Lapebie P., Ruggiero A., Barreau et al. Differential responses to Wnt and PCP disruption predict expression and developmental function of conserved and novel genes in a cnidarian // PLoS Genetics. - 2014. - Vol. 10. - №9. - P. e1004590.

13. Jager M., Queinnec E., Le Guyader H., Manuel M. Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* // EvoDevo. -2011. - Vol. 2. - №1. - P. 1-17.

14. Chevalier S., Martin A., Leclère L., Amiel A., Houliston E. Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* // Development genes and evolution. - 2006. - Vol. 216. - №11. - P. 709-720.

15. Burmistrova Y.A., Osadchenko B.V., Bolshakov F.V., et al. The embryonic development of thecate hydrozoan *Gonothyraea loveni* (Allman, 1859) // Development Growth and Differentiation. - 2018. - Vol. 69. -  $N_{2}$  8. - P. 483-501.

16. Leclere L., Copley R. R., Momose T., Houliston E. Hydrozoan insights in animal development and evolution. Current Opinion in Genetics & Development. - 2016. - Vol. 39. - P. 157–167.

17. Metschnikoff E. Embryologische Studien an Medusen. Ein Beitrag Zur Genealogie der Primitiv-Organe. Wien: Alfred Hölder, 1886. 159 p.

18. Campbell K., Casanova J. A common framework for EMT and collective cell migration. Development. - 2016. - Vol. 143. - №23. - P.4291-4300. 19. van der Sande M., Kraus Y., Houliston E., Kaandorp Y. A cell-based boundary model of gastrulation by unipolar ingression in the hydrozoan cnidarian *Clytia hemisphaerica* // Developmental Biology. - 2020. - Vol. 460. - № 2. - P. 176-186.

20. Momose T., Kraus Y., Houliston E. A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development // Development. - 2012. - Vol. 139. - № 23. - P. 4374-4382.

21. Kraus Y., Technau U. Gastrulation in *Nematostella vectensis* occurs by invagination and immigration: an ultrastructural study // Dev. Genes Evol. - 2006. - Vol. 216. - P. 119 – 132.

22. Beloussov L.V. Patterns of mechanical stresses and formation of the body plans in animal embryos // Verh. Dtsch. Zool. Ges. - 1996. - Vol. 89. - P. 219-229.

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

#### 4.1 Введение

Рост и энергетический обмен, как и большинство процессов, происходящих в онтогенезе животных, обладает определенными ритмами. Подобные ритмы составляют основу жизнедеятельности организмов, являются скорее правилом, чем исключением, и, повидимому, тесно связаны с механизмами регуляции биологических процессов посредством изменения длительности периодов и амплитуды колебаний [1, 2]. Данные о ритмах энергетического обмена суммированы в монографии А. И. Зотина [3]. Наиболее многочисленны сведения по циркадным и сезонным колебаниям основного и стандартного обмена [4, 5]. Циркадные и сезонные ритмы интенсивности потребления кислорода, скорее всего, определяются внешними причинами и приспособлением организмов к специфическим условиям существования жизни на Земле. Животные, однако, имеют и строго эндогенные ритмы. Наиболее известны эндогенные ритмы энергетического обмена, связанные с линьками у членистоногих и ряда других животных [6]. Эндогенные ритмы потребления кислорода с периодом 0.5–3.0 ч были установлены у ряда живых объектов. Например, у дробящихся яйцеклеток [7, 8], в делящихся синхронизированных культурах амеб [9], у взрослых ракообразных [10], млекопитающих [11, 12]. В наших предыдущих работах были выявлены эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в позднем постларвальном онтогенезе пресноводных брюхоногих моллюсков Lymnaea stagnalis [13]. Данная работа посвящена анализу биоритмов интенсивности энергетического обмена в онтогенезе брюхоногого моллюска – Planorbarius corneus [14] и биоритмов ростовых процессов у двустворчатого моллюска - европейской жемчужницы Margaritifera margaritifera [15, 16].

## 4.2 Материалы и методы

4.2.1 Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda).

Моллюсков *P. corneus* L. (Gastropoda, Planorbidae) получали путем разведения в лабораторных условиях. Вылупившихся моллюсков содержали в отстоянной (не менее 2 сут.) водопроводной воде при постоянной температуре 20°С поодиночке в пластиковых стаканах объемом 50 мл. Воду и корм меняли 2 раза в неделю. В качестве корма использовали лист одуванчика (*Taraxacum officinale* Wigg). Всего исследовано 9 животных.

Скорость потребления кислорода измеряли с помощью оксиметра Orion Star A223 RDO/DO portable meter ("Thermo Fisher Scientific", USA). 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.

Интенсивность потребления кислорода рассчитывали путем деления величины скорости потребления кислорода одной особью на массу этой особи.

Первичные данные для каждого моллюска сглаживали с помощью кубических сплайнов при мощности сглаживания 0.8 и получали временной ряд с интервалом 0.5 нед. Вычисления проводили с использованием программы Matlab (версия 7.3.0.267, разработана компанией The MathWorks, Inc, США).

Анализ полученных данных проводили с использованием метода сингулярного спектрального анализа с помощью программы "Гусеница" (версия 3.40, разработана компанией GistaT Group, Россия). Каждый временной ряд разлагали на компоненты в соответствии с формулой [17, 18]:

 $F(t) = T(t) + \Sigma W(t) + N(t) (1.1)$ 

где F(t) – общая временная зависимость исследуемого параметра; T(t) – основной тренд (общее направление изменения исследуемого параметра); W(t) – одна или несколько волновых компонент, связанных с закономерным изменением параметра; N(t) – "шумовая" компонента, связанная со случайными вариациями, вызванными неточностью измерений, флуктуациями параметра и т.д.

При применении программы были выбраны следующие параметры: длина окна (длина "гусеницы") – 22; без центрирования.

Анализ основного тренда и волновых компонент проводили для каждой особи Р. corneus индивидуально. Период колебаний вычисляли как удвоенную разницу между значениями возрастов текущего и следующего локальных экстремумов. Амплитуду колебаний вычисляли как половину разницы между значениями интенсивности потребления кислорода в текущем локальном максимуме и следующем локальном минимуме. "Шумовой" составляющей, связанной со случайными колебаниями измеренных параметров, считали ритмы с периодом меньше, чем промежуток между измерениями, умноженный на 4, то есть 2 нед.

4.2.2. Биоритмы роста европейской жемчужницы *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae).

Индивидуальный линейный рост моллюсков изучался путем измерения

последовательных годовых колец на поверхности раковины. Для описания роста моллюсков в большинстве случаев используют уравнение Берталанфи:

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

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  $t + t_0$ ;  $L_{\infty}$  предельное значение длины раковины; c - константа роста. Использование коэффициентов уравнения Берталанфи позволяет проводить сравнительные внутрипопуляционные, межпопуляционные и межвидовые исследования роста животных.

Створки двустворчатых пресноводных жемчужниц *M. margaritifera* L., выброшенных на берег в результате весеннего паводка, и в результате погибших, были собраны на правом берегу реки Варзуга (Терский район Мурманской области) и реки Вуокинйоки (Карелия). Всего обследовано по 90 раковин моллюсков. Верхний слой конхиолина удаляли кипячением в 1 М КОН в течение 10 мин. В результате такой обработки становятся отчетливо видны годичные кольца роста, образованные призматическим средним слоем (рисунок 4.1). Изображения были получены путем сканирования раковин сканером НР ScanJet 5400с (Китай). Длину каждого неповрежденного годового кольца измеряли с помощью программы Ехсеl с точностью до 0,1 мм.



Рисунок 4.1 - Измерение годовых колец раковины пресноводной жемчужницы

Использовалось единое уравнение роста, частным случаем которого является уравнение Берталанфи [17]:

 $dL_t/L_t dt = V_0 (1-a)^t$ , (2.1) где Lt - длина годичного кольца в возрасте t, V0 - начальная скорость роста, а - коэффициент задержки роста.

Данные были аппроксимированы рекуррентной формой уравнения (1.1):

 $\Delta L = -aL_t + d, \quad d = -V_0/\ln(1-a) + L_0,$  (2.2), где  $\Delta L$  - прирост длины раковины в год, следующий за возрастом t, а L0 - размер раковины в возрасте t = 0. Коэффициенты уравнения. (2) сравнивали с помощью регрессионного анализа. Целесообразность использования этого уравнения оценивалась по критерию нелинейности [20]. Возраст моллюска (T) рассчитывали путем суммирования возраста первого измеренного годового кольца (T1) и количества годичных колец, выделенных на поверхности раковины. Возраст первого измеренного годового измеренного годичного кольца был рассчитан по аналитической форме уравнения (2.1):

$$T_1 = \log_{(1-a)}(1 - aL_1/d),$$

где L1 - длина первого измеренного годового кольца. Необходимость такого метода определения возраста продиктована тем, что почти у всех моллюсков раковина корродирована, а часть годичных колец не обнаруживается. Полученные данные были сглажены, а временной ряд зависимости относительной скорости роста (dL / Ldt) от возраста годового кольца был построен с помощью программы Matlab (версия 7.3.0.267, разработанная The MathWorks, Inc., США).

Основная тенденция и биоритмы определялись методом сингулярного спектрального анализа с использованием программного обеспечения Caterpillar (версия 3.40, разработка GistaT Group, Россия), вариант «без центрирования». Вариант «длина гусеницы» («длина окна») выбирался следующим образом. Если количество измеренных годовых колец не превышало 24, использовали длину окна, равную округленной половине измеренных колец. В противном случае мы используем длину окна, равную 12. Ритмы с периодом менее трех лет считались «стохастическим шумом». Период биоритмов (Р) определяли путем расчета среднего значения удвоенных временных интервалов между последовательными локальными экстремумами. Амплитуду биоритмов (А) рассчитывали как половину разницы между значениями последовательных локальных экстремумов. Зависимость амплитуды колебаний от возраста для угасающих биоритмов аппроксимировалась степенным уравнением (2.3)

$$A = bT^c$$

где А - амплитуда; Т - возраст достижения экстремума, а b и с - коэффициенты.

Аппроксимации уравнениями (2.1) - (2.3) были выполнены с использованием программного обеспечения Matlab (версия 7.3.0.267). Периоды биоритмов в онтогенезе

отдельных моллюсков и средние значения периодов у разных особей сравнивали с помощью теста ANOVA. Статистические распределения, составленные из средних значений параметров, рассчитанных для разных моллюсков, сравнивали с нормальным распределением с помощью критерия χ2. Во всех случаях, когда рассчитывались средние значения, также вычислялась стандартная ошибка среднего.

## 4.3 Результаты и обсуждение

4.3.1. Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda)

Наличие биоритмов, сопровождающих основной тренд становится очевидным уже при анализе кинетики интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии Р. corneus (рисунок 4.2 a). Более подробный анализ с помощью сингулярного спектрального анализа показывает, что изменение интенсивности обмена для каждой особи может быть разложено на следующие составляющие: основной тренд, закономерные волновые составляющие и "шумовая" составляющая. В качестве примера на рисунке 4.2 приведено разложение на составляющие зависимости интенсивности потребления кислорода от возраста Для всех исследованных особей основной тренд показывает у одного из моллюсков. постепенное снижение интенсивности потребления кислорода (рисунок 4.2 а). Изменение интенсивности обмена связано с основным трендом в наибольшей степени (92.3 +/- 1.9%). Наименьший вклад в изменчивость интенсивности потребления кислорода вносит "шумовая" составляющая (0.2 +/- 0.1%). Столь малая величина, вероятно, связана с тем, что основная часть стохастического "шума" была убрана на предварительном этапе подготовки временного ряда при сглаживании экспериментальных данных кубическим сплайном. Более отчетливыми биоритмы становятся выделения волновых составляющих. Закономерные после периодические изменения представлены двумя биоритмами (рисунок 4.2 б, в) со средними значениями периодов 10.8 +/- 1.1 и 4.7 +/- 0.4 нед (n = 9). Вклады биоритмов в изменчивость интенсивности обмена составляют 4.0 +/- 1.1 и 3.5 +/- 2.1% соответственно.

При анализе данных по изменению периодов и амплитуд биоритмов в онтогенезе каждой особи выявляется ряд закономерностей.

1. Для всех биоритмов колебания у разных моллюсков происходят синхронно, т.е. локальные экстремумы приходятся приблизительно на одни и те же возраста.

2. Периоды биоритмов на протяжении онтогенеза одной и той же особи остаются приблизительно постоянными.

3. Все биоритмы затухающие. Причем, наибольшая амплитуда колебаний приходится

на первые 20 нед развития. В дальнейшем она уменьшается, и в пределах чувствительности использованного метода ее можно считать постоянной вплоть до гибели животных.

4. Различия средних значений амплитуд для обоих биоритмов не достоверны. Для моллюсков в возрасте до 20 нед амплитуда в среднем равна 1.1 +/- 0.3, для моллюсков в возрасте более 20 недель – 0.26 +/- 0.07 мкл O<sub>2</sub>/(ч г).



Рисунок 4.2 - Разложение временного ряда скорости потребления кислорода (особь № 8)

*а* – изменение интенсивности потребления кислорода: кружки – исходный временной ряд, линия – основной тренд; *б* – низкочастотная волновая составляющая (период около 10.8 нед); *в* – высокочастотная волновая составляющая (период около 4.7 нед).

Немногочисленность работ, в которых выявлены эндогенные, не зависящие от среды ритмы энергетического обмена, по-видимому, объясняется, во-первых, трудоемкостью подобных исследований, во-вторых, отсутствием до недавнего времени компьютерных программ, позволяющих выявить и проанализировать биоритмы, в-третьих, невысокой точностью измерений, приводящих к тому, что случайный разброс чаще всего маскирует закономерные колебания.

Применение сглаживания кубическими сплайнами и сингулярного спектрального анализа позволяет выявить закономерные ритмические изменения интенсивности энергетического обмена. Эти колебания, по всей вероятности, не связаны с какими-либо периодическими изменениями во внешней среде, т. е. являются эндогенными биоритмами по следующим соображениям:

 – колебания интенсивности потребления кислорода наблюдаются в индивидуальном развитии моллюсков при более или менее постоянных условиях среды;

 периоды колебаний не совпадают с периодами каких-либо известных природных ритмических процессов;

– экстремумы колебаний наблюдаются у животных одного возраста, а не для одних и тех же календарных дней.

В данной работе выявлено два закономерных биоритма интенсивности потребления кислорода. Такое же число биоритмов обнаружено у другого вида водных брюхоногих моллюсков – Lymnaea stagnalis [13]. Низкочастотные биоритмы Р. corneus и L. stagnalis имеют сходные периоды: 10.8 и 10.3 недель соответственно. Периоды высокочастотных биоритмов у этих двух видов различны: 4.7 недель у P. corneus и 7.2 недели у L. stagnalis. Причины такого различия не совсем ясны. Возможно, они связаны с особенностями жизненного цикла моллюсков. Но более вероятно, что периоды высокочастотных биоритмов зависят от условий среды обитания.

Данные, полученные в этом исследовании, показывает, что после вылупления наблюдается постепенное нарастание интенсивности энергетического обмена и к 3–8 недель у *P. corneus* и к 9–10 недель постларвального развития у *L. stagnalis* достигается максимум. Затем наблюдается тенденция к непрерывному снижению интенсивности потребления кислорода вплоть до гибели моллюсков Постоянное снижение интенсивности

энергетического обмена характерно для взрослых животных [21]. Можно предположить, что выявленные биоритмы тесно связаны с адаптацией животных к к изменившимся после выхода из оболочек условиям среды обитания.

Причины колебаний не ясны. Мы полагаем, что обнаруженные колебания могут получить наиболее адекватное объяснение с позиций термодинамики необратимых процессов, которая рассматривает организмы как диссипативные структуры, т. е. определенным образом организованные стабильные структуры, характерной особенностью которых является повышенная по сравнению с окружающей средой диссипация энергии [22]. Формирование таких структур возможно только в открытых системах определенного уровня неравновесности. При этом диссипативные структуры находятся в так называемом неравновесном стационарном состоянии, в котором термодинамические потоки и силы не остаются строго постоянными, а колеблются вокруг некой величины (Пригожин, 1960). В онтогенезе животных выделяют два вида стационарных состояний: текущее, в котором организм находится в настоящее время, и конечное, к которому организм стремится на протяжении всей жизни. Первое стационарное состояние можно связать с понятием "гомеостаз", второе – с понятием "гомеорез" [3]. Таким образом, наличие двух ритмов интенсивности потребления кислорода находится в полном соответствии с выводами термодинамики нелинейных систем и свидетельствует в пользу гипотезы об эндогенной природе наблюдаемых биоритмов.

4.3.2 Биоритмы роста европейской жемчужницы *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae).

Основная тенденция линейного роста особей *М. margaritifera* хорошо описывается уравнением (2.2). Коэффициенты а этого уравнения, определяющие задержку роста, широко варьировали у разных моллюсков от 0,017 до 0,081 год <sup>-1</sup> и существенно различались (p < 0,001). Тем не менее, вариационный ряд, образованный значениями коэффициентов уравнения (2.2) для разных образцов, согласно тесту, имели нормальное распределение. Их средние значения (a = 0,048 +/- 0,001 год <sup>-1</sup>, d = 5,3 +/- 0,1 мм / год (n = 90, где n - количество измерений) могут быть использованы для характеристики исследуемых популяций, а также в межпопуляционных и межвидовых исследованиях. Сингулярный спектральный анализ показал, что основные тенденции изменения размера раковины практически не отличаются от кривой, полученной после анализа роста по формуле (2.2) для всех исследованных образцов.

Анализ кинетики удельной скорости роста в индивидуальном развитии *M. margaritifera* показывает наличие биоритмов, сопровождающих главную тенденцию линейного роста. Биоритмы становятся более отчетливыми после выделения волновых составляющих с помощью сингулярного спектрального анализа. У каждого моллюска было обнаружено до трех устойчивых паттернов биоритмов, различающихся частотой колебаний. Отсутствие низкочастотных ритмов у некоторых моллюсков связано с невозможностью измерить достаточное количество годовых колец, необходимое для их идентификации.

Периоды биоритмов достоверно не различались как в онтогенезе некоторых особей, так и при сравнении разных особей: разница коэффициента линейной регрессии периода по возрастам от нуля была незначительной; вариационный ряд, составленный из значений периодов биоритмов у разных моллюсков, по критерию  $\chi^2$  имел нормальное распределение. Средние значения периодов для всех моллюсков составили 13,39 +/- 0,07 года (n = 50), 6,82 +/- 0,01 года (n = 84) и 4,00 +/- 0,01 года (n = 90).

Биоритмы с периодами 13,4 и 6,8 года угасают. Уменьшение средней амплитуды этих биоритмов с возрастом для всех моллюсков можно описать степенным уравнением (3.2) с теми же коэффициентами ((рисунок 4.3): b =  $176 + - 65 \times 10^{-3}$  / год, c = -1,45 + -0,15 (n = 28). Амплитуда биоритмов с периодом четыре года постоянна и составляет в среднем 0,76 +  $-0,09 \times 10^{-3}$  / год (n = 31). Для изученных моллюсков среднее значение а равно 0,048 и, следовательно, k = 0,049 год -1, что согласуется с константой роста, полученной ранее для популяции реки Варзуга [23]. Межпопуляционная изменчивость констант роста М. margaritifera описана ранее [24, 25, 26, 23]. Значение константы роста 0,049 год  $^{-1}$  является одним из самых низких значений и соответствует значениям k для рек Швеции [26] и Шотландии [25], хотя есть популяции *М. margaritifera* с более низкими значениями константы роста (до 0,01 год -1) [24].

Константа роста имеет тенденцию к уменьшению с увеличением широты местообитаний моллюсков [23, 24]. Однако у этой зависимости есть исключения. Например, самые южные популяции *M. margaritifera* в Испании и Карелии имеют близкие значения k  $\approx$  0.1, несмотря на значительные различия в широте (41 и 61 с.ш. соответственно) и среднегодовых температурах воздуха (15 и 5С соответственно) (CLIMATE-DATA.ORG, 2019). Следовательно, температура - не единственный фактор, определяющий скорость роста *M. margaritifera*. Остается неясным, какие именно факторы влияют на скорость роста моллюсков. Такими факторами могут быть химический состав воды, степень эвтрофикации водоема, водный режим и т. д. Низкочастотный биоритм с периодом 13,4 года аналогичен

биоритму роста морского двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* с периодом 10-15 лет [27]. По мнению Золотарева, эти ритмы имеют экзогенную природу и опосредованы 11летними солнечными циклами. Остальные два биоритма, по-видимому, являются эндогенными и не связаны с периодическими процессами в окружающей среде. Их природа, вероятно, определяется законами термодинамики. Можно предположить, что угасание биоритма с периодом 6,8 года связано с постепенным приближением организма к конечному стационарному состоянию.



Рисунок 4.3 - Зависимость средних значений амплитуд затухающих биоритмов от возраста моллюсков

1, 2 - биоритмы с периодами 13,4 и 6,8 года соответственно; кривая показывает аппроксимацию степенным уравнением (2.3).

## 4.4 Заключение

В онтогенезе пресноводных брюхоногих моллюсков *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda) было выявлено два эндогенных биоритма интенсивности потребления кислорода с периодами 10.8 и 4.7 недель. Локальные экстремумы обоих биоритмов у разных особей приходятся на одни и те же возраста, а их периоды приблизительно одинаковы у всех исследованных животных и остаются неизменными на протяжении индивидуального развития. Оба биоритма затухающие и имеют сходную амплитуду, которая уменьшается по мере увеличения возраста. Можно предположить, что выявленные биоритмы тесно связаны с адаптацией животных к условиям среды обитания, изменяющимся по мере смены стадий онтогенеза. Наличие двух ритмов интенсивности потребления кислорода находится в полном соответствии с выводами термодинамики нелинейных систем и свидетельствует в пользу гипотезы об эндогенной природе наблюдаемых биоритмов.

Индивидуальный линейный рост пресноводной жемчужницы Margaritifera margaritifera в двух популяциях был изучен путем измерения последовательных годовых колец на поверхности раковины. Оказалось, что рост каждого моллюска сопровождается тремя регулярными биоритмами, причем первые два биоритма затухают, а последний имеет постоянную амплитуду. Эти периоды биоритмов были практически постоянными как в онтогенезе каждой особи, так и при сравнении особей в популяции. Различия между популяциями, населяющими сходные условия, были незначительными. Средние периоды биоритмов в изученных популяциях составили 13,3 (13,4), 6,4 (6,8) и 4,0 года. Коэффициенты замедления роста широко варьируют и значительно различаются у разных особей и зависит от возраста мидий. Низкочастотный биоритм с периодом 13,3 (13,4) года имеет экзогенную природу и опосредован колебаниями условий среды, такими как химический состав воды, степень эвтрофикации водоема, водный режим и т. д. Остальные два биоритма, по-видимому, являются эндогенными и не связаны с периодическими процессами в окружающей среде. Их природа, вероятно, определяется законами термодинамики. Можно предположить, что угасание биоритма с периодом 6,4 (6,8) года связано с постепенным приближением организма к конечному стационарному состоянию.

4.5 Список использованных источников

1. Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.

2. Бродский В.Я., Нечаева Н.В. Ритмы синтеза белка. М.: Наука, 1988. 240 с.

3. Зотин А.И. Термодинамическая основа реакции организмов на внешние и внутренние факторы. М.: Наука, 1988. 272 с.

4. Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. М.: Изд-во МГУ, 1962. 444 с.

5. Dawson W.R., Hudson J.W. Birds // Comp. Physiol. of Thermoregulation. N.Y.: Acad. Press, 1970. V. 1. P. 224–310.

6. Клейменов С.Ю. Энергетический обмен растущих личинок сверчка *Acheta domestica* L. по данным непрямой и прямой калориметрии // ДАН. - 1997. - Т. 353. - № 5. - С. 690–692.

7. Zeuthen E. Cyclic in oxygen consumption in cleaving eggs // Exp. Cell Res. - 1960. - V. 19. - N 1. - P.

8. Зотин А.И. Изменение скорости продукции энтропии во время эмбрионального развития и роста // Биофизика. - 1966. - Т. 11. - № 3. - С. 554–557.

9. Edwards S.W., Lloyd D. Oscillations of respiration and adenine nucleotides in synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*: mitochondrial respiratory control in vivo // J. Gen. Microbiol. - 1978. - V. 108. - Pt 2. - P. 197–204.

10. Palmer J.D. Biological clocks in marine organisms. N.Y.: Wiley, 1974. 173 p.

11. Kayser C., Hildwein G. Evolution de la consommation d'oxygen et de l'activité du cobaye au cours du nycthémère // Arch. Sci. Physiol. - 1974. - V. 28. - N 1. - P. 1–23.

12. Stupfel M., Davergne M., Peramon A., Lemercerre C., Gourlet V. Rythmes ultradiens respiratoires de quatre petits vertébrés // C. R. Acad. Sci. D. - 1979. - V. 289. - N 9. - P. 675–678.

13. Зотин А.А., Клейменов С.Ю. Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda) // Изв. РАН. Сер. биол. - 2013. - № 6. - С. 653–660.

14. Zotin A.A. Endogenous Biorhythms of Mass Specific Rate of Oxygen Consumption in *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda) Individual Development // Russ. J. Dev. Biol. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 255-260.

15. Zotin A.A. Growth Biorhythms of the European Pearl Mussel Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae) of the Varzuga River Population (Murmansk Oblast) // Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – Is. 4. – P. 381-388.

16. Zotin A.A., Murzina S.A., Filippova K.A., Ieshko E.P. Growth parameters of the freshwater pearl mussel Margaritifera Margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae), Vuokinjoki river population (Karelia) // Malacologia. – 2020. – Vol. 63. – No 1. – P. 67-75.

17. Главные компоненты временных рядов: метод "Гусеница". /Под ред. Данилова Д.П., Жиглявского А.А. СПб: Изд-во СГПбУ, 1997. 308 с.

18. Крянев А.В., Лукин Г.В. Метрический анализ и обработка данных. М.: Физматлит, 2010. 279 с.

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

20. Zotin A.A. Statistical estimation of allometric coefficients // Biol. Bull. (Moscow). - 2000. V. 27. - N. 5. - P. 431-437.

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

22. Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов. М.: ИЛ, 1960. 127 с.

23. Zotin A.A., Ieshko E.P. Biorhythms of *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae) freshwater pearl mussel growth: population of Syuskyuyanioki River (Karelia) // Russ. J. Dev. Biol. - 2018. - V. 49. N. 4. - P. 206–213.

24. Bauer G. Variation in life span and size of the freshwater pearl mussel // J. Anim. Ecol. - 1992 - V. 61. - P. 425–436.

25. Hastie LC., Young M.R., Boon P.J. Growth characteristics of freshwater pearl mussels, Margaritifera margaritifera (L.) // Freshwater Biol. - 2000. - V. 43. - P. 243–256.

26. Dunca E., Söderberg H., Norrgrann O. Shell growth and age determination in the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Sweden: natural versus limed streams // Ferrantia. - 2011. - V. 64. - P. 48–58.

27. Zolotarev V.N. Long-term growth rhythms of *Glrayan* mussel shells // Ekologiya. - 1974. - N 3. - P. 76-80.

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

#### 5.1 Введение

Эпизоды гипоксии разной длительности могут наблюдаться в пренатальный период развития. Сердечно-сосудистая система - одна из наиболее уязвимых к гипоксии у развивающихся организмов. Кроме этого, нарушения работы сердца, вызванные гипоксией в пренательный период, могут проявляться после рождения, вызывая сердечно-сосудистые заболевания.

Куриный зародыш является распространенным экспериментальным объектом для изучения пренатальной гипоксии. Многочисленные исследования показывают, что инкубация яиц в условиях острой и хронической гипоксии приводит к множественным структурным и функциональным сердечным нарушениям у эмбриона [например, 1-5]. Ранее мы обнаружили двухфазный гипоксический ответ сердечного ритма на 10 и 14 сут инкубации куриного зародыша и предположили, что это частичное восстановление частоты сердечных сокращений (ЧСС) на фоне гипоксии происходит за счет участия в нем развивающейся нервно-гормональной регуляции сердечной активности у зародыша [4]. В то же время мало известно относительно сердечного гипоксического ответа на ранних стадиях развития. Поэтому наши исследования были сосредоточены на 4 сут инкубации куриного зародыша, когда нервная и гормональная регуляция работы сердца еще отсутствуют. Задачей данного исследования было изучить пошагово (определяли ЧСС за каждые 10 сек регистрации) динамику ответа сердечного ритма 4-суточного куриного зародыша при сильной острой гипоксии (5%O<sub>2</sub> 20 мин) и сравнить гипоксические эффекты в яйце (*in ovo*) и у изолированного сердца (in vitro). Это поможет прояснить возможные факторы, участвующие в поддержании ЧСС зародыша при гипоксии на 4 сут инкубации, когда нервная и гормональная регуляция сердца еще отсутствуют, и выяснить присутствуют ли эти факторы в структурах яйца, или они находятся в самом эмбриональном сердце.

#### 5.2 Материалы и методы

Куриные яйца (*White Leghorn*) инкубировали в лабораторном инкубаторе (TGB-Plast Manuf. Co., Россия) при температуре 37.5±0.5°С и влажности 60-70%. На 4 сут инкубации после предварительной препаровки яйцо (в экспериментах *in ovo*) или изолированное сердце (в экспериментах *in vitro*) помещали в экспериментальную камеру, постоянно аэрированную

влажным атмосферным подогретым (37.5°С) воздухом (скорость протока 180 ml/min; Intelligent Subsampler TR-SS3 pump, Sable Systems International, USA). При гипоксии через камеру с такой же скоростью пропускали влажную газовую смесь азота и кислорода (95%N2 и 5%O2) в течение 20 мин. После этого следовало восстановление в воздухе в течение 30 мин.

Из-за малого размера сердца для регистрации его сокращений *in ovo* и *in vitro* использовали видеорегистрацию. Для этого использовали микроскоп (OPTIKA 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. Использовали также анализ Фурье, который проводили с помощью программы DanioScope. Пример регистрации активности сердца зародыша *in ovo* и *in vitro* на 4 сут инкубации полученный с помощью программы DanioScope представлен на рисунке 5.1.





Правая панель представляет результат анализа Фурье, пик демонстрирует ведущую частоту сокращений сердца в минуту. На рисунке (Б) обозначения буквами пиков на записи сокращений изолированного сердца соответствуют сокращениям отмеченных на фотографии отделов сердца на 4 сут инкубации: "a" – atrium (предсердие), "v" – ventricle (желудочек) и "oft" – outflow tract (отводящий тракт).
Следуя протоколу экспериментов, первоначально ЧСС стабилизировалась 30 минут при нормоксии (21% O<sub>2</sub>). Затем после следующих 30 минут в нормоксии (контроль) ЧСС регистрировали при гипоксии 20 минут, и после этого снова следовали 30 минут восстановления в нормоксии.

В экспериментах *in vitro* изолированное сердце (состоящее из желудочка, предсердия и outflow tract) помешали в чашку Петри диаметром 4 см, заполненную (0,5 mL) теплым раствором Хэнкса. Затем препарат изолированного сердца помещали в ту же экспериментальную камеру, которая использовалась в экспериментах *in ovo*.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica7.0 (StatSoft, USA). Использовали nonparametric Wilcoxon matched-pairs test, чтобы оценить гипоксический эффект на ЧСС зародыша и ее восстановление в нормоксии. Различия считались достоверными при P < 0.05. Все данные представлены как mean  $\pm$  S.E.M.

## 5.3 Результаты и обсуждение

В наших экспериментах средняя ЧСС эмбриона в контроле *in ovo* составляла  $164 \pm 2,5$  уд/мин, что было значительно выше, чем у изолированных сердцах в экспериментах *in vitro* (118 ± 8 уд/мин, *p* <0,05). Эти величины и их различие согласуются с результатами предыдущих исследований *in ovo* [например, 1, 6] и *in vitro* [7], выполненных на курином зародыше на 4 сут инкубации. Эти различия средней ЧСС *in ovo* и *in vitro* могут быть связаны с отсутствием у изолированных препаратов сердца кровообращения и различных физиологически активных веществ, присутствующих в яйце.

В экспериментах на изолированном сердце куриного зародыша на 4 сут инкубации гипоксия 5%O<sub>2</sub> вызывала выраженный ингибиторный эффект (рисунок 5.2 A), как это наблюдается и в экспериментах *in ovo* (рисунок 5.2 Б). В то же время, наши исследования показали важные различия между гипоксическим ответом *in vitro* и *in ovo* (рисунок 5.2 A и Б). Во-первых, ингибиторный эффект был сильнее у изолированных сердец, чем в экспериментах *in ovo*. Так в начале гипоксии ЧСС изолированного сердца резко снижалась до  $29 \pm 14\%$  от исходного уровня (N=6, p < 0.05), а в случае экспериментов *in ovo* ЧСС снижался только до  $65\pm2.3\%$  от контроля (N=14, p<0.01). Во-вторых, в отличие от экспериментов *in ovo*, в экспериментах *in vitro* фаза восстановления ЧСС на фоне гипоксии была слабой и короткой (рисунок 5.2 А). В-третьих, у изолированного сердца в период восстановления после гипоксии не наблюдали овершут ЧСС, наблюдаемый в экспериментах *in ovo* (рисунок 5.2 Б), и ЧСС в экспериментах *in vitro* восстанавливался только частично, не достигая контрольной величины в течение 30 мин в воздухе после гипоксии (рисунок 5.2 А).



Рисунок 5.2 - Эффект острой гипоксии (5%O<sub>2</sub>, 20 мин) на сердечный ритм изолированного сердца *in vitro* (А) и в экспериментах *in ovo* (Б)

Левые рисунки демонстрирует типичный пример изменения ЧСС отдельного эмбриона в эксперименте: до гипоксии (baseline), во время гипоксии (зеленая линия) и при восстановлении в воздухе после гипоксии (recovery). На правых гистограммах представлено изменение среднего ЧСС ( $\pm$  S.E.M, N=6) в периоды эксперимента, отмеченные на левых рисунках: (1 - первоначальное снижение ЧСС в начале гипоксии; 2 - частичное восстановление ЧСС на фоне гипоксии; 3 - овершут ЧСС в начале восстановления после гипоксии; 4 - конечное восстановление ЧСС на воздухе после гипоксии). Эти периоды отмечены красной рамкой на левом рисунке. Среднее значение ЧСС в контроле (baseline) вычисляли за последние 10 минут в нормоксии перед началом гипоксии. Звездочками отмечено достоверное различие между средним значениями ЧСС, которые соединены горизонтальными скобками (\* - p < 0.05 and \*\* - p < 0.01; Wilcoxon test).

Кроме этого, важным дополнительным результатом исследования является овершута ЧСС (длительность 6 мин; амплитуда 6-8% выше контрольной величины), обнаруженный в начале восстановления после гипоксии в экспериментах *in ovo* (см. рисунок 5.2 Б). Мы предполагаем, что постгипоксический овершут ЧСС может быть связан с избыточным количеством катехоламинов во время гипоксии. Механизмы этого явления требуют дополнительного исследования.

Новые дополнительные данные мы также получили при пошаговом анализе динамики гипоксического ответа ЧСС *in ovo*. Было показано, что снижение ЧСС во время гипоксии представляет собой не просто постепенные изменения доминирующей частоты сердечных сокращений, но и наблюдается переключение паттерна ЧСС между более высокой и низкой частотой. В частности, как показано на рисунке 5.3, при гипоксии (5%O<sub>2</sub> 20 мин) *in ovo* фаза первоначального снижения ЧСС состояло как из снижения высокочастотного компонента ЧСС (с 161 ± 5 до 135 ± 2 уд/мин; N = 6), так и из появления заметного низкочастотного (72 ± 2 уд/мин; N = 6) компонента ЧСС (b на рисунке 5.3). Этот наблюдаемый паттерн изменений ЧСС напоминает эпизодическую брадикардию, явление, которое часто встречается у недоношенных новорожденных и связано как с рефлекторным ответом, так и с прямым влиянием гипоксии на сердце [8, 9]. Поскольку сердце ранних куриных эмбрионов не имеет иннервации, наблюдаемая здесь брадикардия, вызванная гипоксией, должна быть связана с прямым воздействием гипоксии на сердечные миоциты [10, 11] или, что более вероятно, на активность синоатриальных пейсмекерных клеток сердца, которые обычно отвечают за запуск каждого сердечного сокращения. Дальнейшие исследования могут помочь объяснить механизмы обнаруженного нами переключения паттерна ЧСС между более высокой и низкой частотой при острой гипоксии.



# Рисунок 5.3 - Пример ответа сердечного ритма на острую гипоксию (5%O<sub>2</sub>, 20 мин) куриного зародыша на 4 сут инкубации *in ovo*: в контроле, при гипоксии (зеленая линия) и при восстановлении после гипоксии

Толстая и тонкая синие линии показывают изменение среднего ЧСС за каждые мин или 10 сек, соответственно. Рисунки, расположенные внизу под графиком, демонстрируют записи регистрации ЧСС в периоды, отмеченные рамкой на верхнем графике и соответствующей буквой: (а) – во время контроля (b) – во время начала гипоксии. Анализ Фурье, представленный справа от этих рисунков, демонстрируют пики, соответствующие основным частотам сердечного ритма в данных периодах эксперимента.

#### 5.4 Заключение

Основным и новым открытием нашего исследования является то, что у куриного зародыша на 4 сут инкубации способность к частичному восстановлению сердечного ритма и его дальнейшее поддержание при гипоксии in ovo зависит от целостности организма, поскольку эта способность не наблюдалась у изолированного сердца (in vitro). В свете этих результатов требуется обсуждение следующие основные Каковы вопросы: (1)физиологические последствия подавления сердечной деятельности эмбриона в раннем возрасте? (2) Каково физиологическое значение частичного восстановления ЧСС в условиях гипоксии? (3) Какие механизмы лежат в основе этого частичного восстановления на ранних стадиях развития, когда отсутствуют нервные и гормональные регуляторных механизмов? Эти вопросы мы начали обсуждать в статье [12] и полагаем, что некоторые факторы, присутствующие в яйце, такие как, например, катехоламины, могут иметь решающее значение для гипоксического ответа эмбриона у птиц и их выживания. Планируются дальнейшие исследования источников катехоламинов при острой гипоксии.

## 5.5 Список использованных источников

1. Akiyama R., Mitsubayashi H., Tazawa H., Burggren W.W. Heart rate responses to altered ambient oxygen in early (days 3–9) chick embryos in the intact egg // J. Comp. Physiol. B – 1999.-Vol. 169. P. 85–92

 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

3. Chan T., Burggren W.W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (Gallus gallus) // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2005- Vol. 145. P. 251–263

4. 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.

5. Jonker S.S., Giraud G.D., Espinoza H.M., Davis E.N., Crossley 2nd D.A. Effects of chronic hypoxia on cardiac function measured by pressure-volume catheter in fetal chickens //Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2015 – Vol. 308(8). P. R680–R689

6. Kockova R., Svatunkova J., Novotny J., Hejnova L., Ostadal B., Sedmera D. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2013.-Vol.30. P. H895–H902

7. Sedmera D., Kucera P., Raddatz E. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation//Am. J. Physio.l Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2002.- Vol. 283. P. R379–R388

8. Upton C.J., Milner A.D., Stokes G.M. Episodic bradycardia in preterm infants //Arch. Dis. Child. – 1992 – Vol. 67. P. 831–834

9. Poets C.F., Stebbens V.A., Samuels M.P., Southall D.P. The relationship between bradycardia, apnea, and hypoxemia in preterm infants // Pediatr. Res. – 1993 – Vol. 34. P. 144 – 147

10. Barry W.H., Pober J., Marsh J.D., Frankel S.R., Smith T.W. Effects of graded hypoxia on contraction of cultured chick embryo ventricular cells // Am. J. Physiol. – 1980.- Vol. 239(5). P. H651–657

 Duranteau J., Chandel N.S., Kulisz A., Shao Z., Schumacker P.T. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes // J. Biol. Chem. - 1998 – Vol. 273.
 P. 11619–11624

 Nechaeva M., Alekseeva T., Dobretsov M., Kubasov I. Chicken embryos can maintain heart rate during hypoxia on day 4 of incubation // J. Comp. Physiol. B. – 2020. – Vol. 190(3). P. 361-370

# РАЗДЕЛ 6 ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БИОМОЛЕКУЛ

## 6.1 Введение

В скелетных и сердечных мышцах позвоночных тропомиозин (ТПМ) в ассоциации с тропонином (ТН) играет центральную роль в кальциевой регуляции акто-миозинового взаимодействия и, следовательно, сокращения и расслабления мышц [1, 6]. Молекула ТПМ представляет собой димер α-спиралей, образующих левостороннюю спираль, структура которой основана на так называемых гептадных повторах. В гептаде гидрофобные остатки 1-й и 4-й (обозначенные как а и d) образуют непрерывное гидрофобное ядро, которое склеивает α-спирали вместе. Ядро дополнительно стабилизируется электростатическими взаимодействиями между противоположно заряженными остатками в положениях е и g [7, 12].

В медленных скелетных мышцах экспрессируются в основном две изоформы тропомиозина – γ и β, которые являются продуктами генов. Эти изоформы ТПМ образуют γγ-гомодимер и γβ-гетеродимеры. ββ-гомодимеры крайне нестабильны при физиологических условиях.

В гене *ТРМ3*, кодирующем мышечный тропомиозин. были обнаружены многочисленные точечные мутации, связанные с генерализованной мышечной слабостью и связанные с генезом таких заболеваний медленных скелетных мышц, как немалиновая миопатия, врожденная диспропорция волокнистого типа (CFTD) и болезнь кэп-миопатия [3, 8]. Описаны клинические проявления, гистология и генетика патологий, вызванных этими мутациями. При этом свойства миопатий, ассоциированных с мутациями ТПМ, плохо изучены. Было показано, что мутация M9R вызывает немалиновую миопатию (1). Эта мутация резко снижала сродство уу-ППМ к актину 21, но не влияла на термическую стабильность ТПМ [9]. Интригующей особенностью мутации М9R является то, что она снижала уровень β-ТПМ в медленных скелетных мышцах человека и трансгенной модели мыши, вероятно, из-за нестабильности γβ-гетеродимера, образованного с этим мутантным белком [1].

Наша работа была направлена на изучение влияния трех миопатических мутаций в цепочке γ-ТПМ - M9R, E151A и K169E на структурно-функциональные свойства медленной скелетной мышцы ТПМ, ее γγ-гомодимера и γβ-гетеродимера. Все предыдущие исследования проводились только на γγ-гомодимерах ТПМ с мутациями в обеих γ-цепях и только с быстрым скелетным миозином в анализе подвижности *in vitro*. Дело в том, что у больных

миопатией, имеющих гетерозиготный фон, ТПМ үү-гомодимеры могут существовать с мутацией как в одной, так и в обеих ү-цепях. Как было показано на примере ТПМ аагомодимера, несущего мутацию только в одной а-цепи, его свойства могут отличаться от свойств аа-гомодимера с мутациями в обеих а-цепях [10]. Кроме того, быстрый и медленный миозин по-разному влияет на активацию тонкой нити, содержащей димеры ү-ТПМ. Для изучения влияния этих мутаций на регуляторную функцию ТПМ мы использовали более подходящую модель взаимодействия актин-миозин в медленных мышцах, используя для экспериментов с димерами ү-ТПМ в анализе подвижности in vitro миозин и TH из медленных скелетных мышц. Кроме того, мы изучали  $\gamma\gamma$  - гомодимер ТПМ с мутациями только в одной из двух  $\gamma$  – цепей.

## 6.2 Материал и методы

Экспрессия ТПМ. Все формы ТПМ представляли собой рекомбинантные белки, имеющие Ala-Ser N-концевое дополнение для имитации естественного N-концевого ацетилирования нативного ТПМ [11] конструкция для медленного скелетного мышечного γ-ТПМ (Трт3.12) была получена синтезом кодирующей последовательности в компании "Евроген" (Москва, Россия). Мутанты M9R, E151A и K169E γ-ТПМ были получены в бактериальной экспрессионной плазмиде pMW172 методом ПЦР-опосредованного сайтнаправленного мутагенеза с использованием ДНК-полимеразы Pfu (Сибэнзим, Новосибирск, Россия).

*Метод кругового дихроизма*. Дальние УФ-кд-спектры видов ТПМ регистрировали при температуре 5°С на КД - спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Surrey, Великобритания) в ячейках размером 0,02 см. Измерения теплового разворачивания проводили по молярной эллиптичности ТПМ при 222 нм в диапазоне температур от 5°С до 65°С при постоянной скорости нагрева 1°С / мин. Все измерения проводили в 30 мм буфере Hepes-Na, pH 7,3, содержащем 100 мм NaCl и 1 мм DTT.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Эксперименты ДСК с үү - и ү\*ү\*-гомодимерами ТПМ проводили на дифференциальном сканирующем калориметре MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Instruments, Northampton, MA 01060, США) при скорости нагрева 1°С/мин в 30 мм HEPES-Na буфере (рН 7,3), содержащем 100 мм NaCl. Концентрация белка составляла 2 мг/мл. Обратимость кривых теплопоглощения оценивали путем повторного нагрева образца сразу после его охлаждения после предыдущего сканирования. Тепловая денатурация всех гомодимеров ТПМ была полностью обратима. Температурная зависимость избыточной теплоемкости была дополнительно проанализирована и построена с помощью программного обеспечения Origin (MicroCal Inc, Northampton, MA, USA). Деконволюционный анализ кривых сорбции тепла, то есть их разложение на отдельные тепловые переходы (калориметрические Домены) путем аппроксимации данных моделью non-two-state.

# 6.3 Результаты и обсуждение

Для предварительного изучения влияния мутаций M9R, E151A и K169E в у-цепи на вторичную структуру и тепловое развертывание различных димеров ТПМ ипользовали метод кругового дихроизма (КД). Спектры КД, записанные при 5°С, были практически идентичны для всех анализируемых образцов ТПМ и показали два отрицательных пика при 208 и 222 нм, характерных для спиральных белков. Тепловая денатурация этих видов ТПМ была исследована путем измерения эллиптичности при 222 нм, которая отражает содержание αспирали в молекуле ТПМ (рисунок 6.1). Результаты показали, что только мутация К169Е вызывает снижение термической стабильности уу-гомодимера ТПМ. Мутации М9R и E151A в обеих у-цепях не оказывали выраженного влияния на тепловую денатурацию молекулы ТПМ (рисунок 6.1 А). Мутация К169Е лишь незначительно повышала термостабильность гетеродимера уу\*-ТПМ, в то время как мутации M9R и E151A незначительно снижали ее (рисунок 6.1 В). Что касается ТПМ у-гомодимера с мутацией M9R, E151A или K169E только в одной у-цепи, то заметных различий между кривыми КД, полученными для этих мутантов ТПМ, не наблюдалось, хотя кооперативность этих кривых была заметно меньше, чем у WT уу - ТПМ. По сравнению с WT үү - ТПМ все эти мутанты ТПМ были менее стабильны в диапазоне 30-55°C, но более стабильны при более высокой температуре (рисунок 6.1 C).



Рисунок 6.1 - Кривые КД-измерений теплового развертывания гомодимеров Гомодимеры γγ-ТПМ (A, C) и гетеродимеры γβ-ТПМ (B), несущие мутации M9R, E151A или К169E в γ-цепи, по сравнению с WT ТПМ үγ- гомодимерами (A, C) и γβ- гетеродимерами (B). Здесь и далее γ\* обозначает γ-цепь, несущую мутацию, а γ\*γ (C) соответствует γγгомодимеру с мутацией только в одной из двух γ-цепей соответственно. Температурные зависимости содержания α-спирали измерялись как эллиптичность при 222 Hм при постоянной скорости нагрева 1°C / мин. Концентрация белка составляла 1 мг/мл для үγ-и γ\*γ\* - ТПМ (A) и 0,5 мг/мл для γβ -, γ\*β - и γ\*γ-ТПМ (B, C).

Для детального изучения влияния мутаций на тепловую денатурацию и доменную структуру молекулы ТПМ мы применили метод ДСК. Однако этот метод требует довольно высокой концентрации ТПМ, что было практически неприемлемо для  $\gamma^*\gamma$ -ТПМ и  $\gamma^*\beta$ -ТПМ из-за низкой концентрации конечного белка [2]. Поэтому мы использовали ДСК только для  $\gamma^*\gamma^*$ -ТПМ, который показал, согласно измерениям КД (рисунок 6.1 A), наиболее выраженный дестабилизирующий эффект мутации К169Е. В соответствии с данными КД (рисунок 6.1 A) профили ДСК показали, что мутации M9R и E151A не оказывают видимого

влияния на тепловую денатурацию γ\*γ\*-ТПМ. Напротив, мутация K169E снижала термическую стабильность γ\*γ\*-ТПМ (рисунок 6.2).



Рисунок 6.2 - ДСК-измерения тепловой денатурации үү-гомодимеров ТПМ, несущих мутации M9R, E151A и K169E в обеих ү-цепях, по сравнению с WT үү-TПМ.

ДСК позволяет разложить кривую теплопоглощения на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), соответствующие плавлению различных частей молекулы ТПМ, и определить, как мутации влияют на ее структуру [4]. На рисунке 6.3 показаны результаты деконволюции профилей ДСК для  $\gamma^*\gamma^*$  - ТПМ с мутациями М9R или К169E по сравнению с таковыми для  $\gamma\gamma$  – ТПМ, не несущего мутаций (WT). Профиль ДСК для  $\gamma^*\gamma^*$ - ТПМ с мутацией E151A был сходен и почти неотличим от профиля WT  $\gamma\gamma$ -ТПМ (рисунок 6.2) и поэтому не представлен на рисунке 6.3.



Рисунок 6.3 - Температурные зависимости избыточной теплоемкости (С<sub>р</sub>), измеренной методом ДСК и деконволюционного анализа кривых теплопоглощения WT үү-TПМ (А) и ү\*ү\*-TПМ мутантных конструктовМ9R (В) и К169Е (С). Сплошные линии представляют экспериментальные кривые после вычитания инструментальных и химических базовых линий. Пунктирные линии - отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные в результате аппроксимации данных моделью "non-two-state".

Основные параметры калориметрических доменов (температура перехода, ТМ и калориметрическая энтальпия, ΔH<sub>cal</sub>) для всех видов ТПМ сведены в таблицу 1.

ТПМ	$T_{max}(^{\circ}C)$	$\Delta H_{cal}$ (kJ/mol)	$\Delta H_{cal}$ (% от общ.)	$\Delta { m H}_{ m cal}$ общая
γγ -ΤΠΜ WT				1050
Домен 1	47,9	290	27	
Домен 2	51,4	490	47	
Домен 3	57,5	270	26	
γ*γ*-ΤΠΜ M9R				1220
Домен 1	46,8	80	6,5	
Домен 2	50,8	670	55	
Домен 3	57,6	470	38,5	
ү*ү*-ТПМ Е151А				1070
Домен 1	46,0	310	29	
Домен 2	51,3	560	52	
Домен 3	57,2	200	19	
ү*ү*-ТПМ К169Е				900
Домен 1	41,9	310	34	
Домен 2	47,9	340	38	
Домен 3	56,4	250	28	

Таблица 6.1 - Калориметрические параметры, полученные по данным ДСК для отдельных тепловых переходов (калориметрических доменов) ТПМ үү-гомодимеров WT и с мутациями M9R, E151A и K169E.

На профилях ДСК все виды ТПМ демонстрировали три тепловых перехода, то есть калориметрические домены (рисунке 6.3, таблица 6.1). Два из них, Домены 2 и 3, относятся к тепловой денатурации С- и N-концевой частей  $\gamma\gamma$ -TПМ соответственно [4]. Калориметрическая область 1 соответствует тепловой денатурации другой части (частей) молекулы с пониженной термостабильностью, такой как ее средняя часть [6], соединение головы к хвосту между N-и C-концами соседних молекул TПМ и т. д. Калориметрическая энтальпия ( $\Delta H_{cal}$ ) домена 1 для  $\gamma^*\gamma^*$ -TПМ М9R была значительно меньше, чем для всех других изученных TПМ (таблица 6.1). Мутация К169Е снижала термическую стабильность калориметрического домена 2 и заметно снижала энтальпию этого домена (таблица 6.1). Эти результаты указывают на то, что мутация К169Е дестабилизирует C-концевую часть молекулы TПМ.

# 6.4 Заключение

Мутации в гене *TPM3* приводят к развитию нескольких наследственных миофибриллярных миопатий, характеризующихся повреждением сократительного аппарата медленных мышц, которые вызывают мышечную слабость, дыхательную недостаточность и др. Большинство мутаций в гене *TPM3* индуцируют один тип наследственных миопатий. Некоторые мутации, однако, могут проявляться в виде различных патологий среди членов одной семьи, например, немалиновая миопатия и дисбаланс мышечных волокон, что

указывает на сложность и разнообразие механизмов развития миопатии. Ранее молекулярные механизмы развития миопатий изучались на γ-ТПМ с мутациями в обеих цепях.

Мы исследовали структурно-функциональные свойства молекул ТПМ, несущих мутацию в одной цепи  $\gamma\gamma$ - и  $\gamma\beta$ - ТПМ. Благодаря такому подходу нам удалось выявить молекулярные механизмы развития немалиновой миопатии, вызванной мутацией М9R и связанным с ней накоплением ТПМ  $\beta$  - и  $\gamma$  - цепей в немалиновых телах [5]. ТПМ  $\gamma^*\gamma^*$ - и  $\gamma^*\beta$ - димеров с M9R мутации были неспособны связывать актин и регулирует актин-миозинового взаимодействия, в отличие от  $\gamma^*\gamma$ -ТПМ. Поскольку большинство замен находятся в гетерозиготном состоянии,  $\gamma^*\gamma$  - ТПМ может присутствовать у пациентов. По нашим данным, мутация К169E на молекулярном уровне нарушает активацию тонкой нити миозином. Он снижает Ca<sup>2+</sup> - чувствительность актин-миозинового взаимодействия, что объясняет снижение Ca<sup>2+</sup> - силового соотношения мышечных волокон у пациентов с диспропорцией мышечных волокон. Мы впервые изучили на молекулярном уровне структурно-функциональные свойства димеров ТПМ с мутацией E151A в  $\gamma$ -цепи, вызывающих миопатию кап, и их взаимодействие с актином. Наши результаты объясняют мышечную слабость при наличии этой мутации снижением чувствительности Ca<sup>2+</sup> и скорости скольжения тонких нитей в анализе подвижности *in vitro*.

## 6.5 Список использованных источников

1. Corbett MA, Akkari PA, Domazetovska A, et al. A Tropomyosin mutation alters dimer preference in nemaline myopathy // Ann Neurol. - 2005. - Vol. 57. - P. 42-49.

2. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Shubin V.V., Kleymenov S.Y., Kurganov, B.I. Effect of arginine on stability and aggregation of muscle glycogen phosphorylase b // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 165. – P. 365-374. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.

3. Marttila M, Lehtokari V-L, Marston S, et al. Mutation update and genotype–phenotype correlations of novel and previously described mutations in TPM2 and TPM3 causing congenital myopathies // Hum Mutat. - 2014. - Vol. 35. - P. 779-790.

4. Matyushenko AM, Kleymenov SY, Susorov DS, Levitsky DI. Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle isoforms of tropomyosin // Biophys Chem. - 2018. - Vol. 243. - P. 1-7.

5. Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Pivovarova A.V., Kleymenov S.Y., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosin TPM3 gene//FASEB Journal. – 2020. – Vol. 34. – Is. 10. – P. 13507-13520. DOI: 10.1096/fj.202001318.

6. Matyushenko AM, Shchepkin DV, Kopylova GV, et al. Functional role of the core gap in the middle part of tropomyosin // FEBS J. - 2018. - Vol. 285. - P. 871-886.

7. McKillop DF, Geeves MA. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment-1: evidence for three states of the thin filament // Biophys J. - 1993. - Vol. 65. - P. 693-701.

8. Memo M, Marston S. Skeletal muscle myopathy mutations at the actin tropomyosin interface that cause gain- or loss-of-function. J Muscle Res Cell Motil // 2013. - Vol. 34. - P. 165-169.

9. Moraczewska J, Greenfield NJ, Liu Y, Hitchcock-De-Gregori SE. Alteration of tropomyosin function and folding by a nemaline myopathy-causing mutation // Biophys J. - 2000. Vol. 79. - P. 3217-3225.

10. Janco M, Kalyva A, Scellini B, et al.  $\alpha$ -Tropomyosin with a D175N or E180G mutation in only one chain differs from tropomyosin with mutations in both chains. Biochemistry // 2012. - Vol. 51. - P. 9880-9890.

11. Monteiro PB, Lataro RC, Ferro JA, Reinach FC. Functional alpha-tropomyosin produced in Escherichia coli. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group // J Biol Chem. - 1994. - Vol. 269. P. 10461-10466.

12. Perry SV. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function // J Muscle Res Cell Motil. - 2001. - Vol. 22. - P. 5-49.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование в рамках данной научной темы посвящено одной из важнейших задач современной биологи развития - выявлению и анализу фундаментальных механизмов регуляции онтогенеза, обеспечивающих устойчивость развивающейся системы. Решение поставленных задач проводилось на молекулярном, клеточном и организменном уровнях организации при использовании широкого круга модельных объектов, от базальных многоклеточных (книдарий) до позвоночных животных (птиц и млекопитающих).

Накопление знаний о развитии, строении и работе мужской и женской репродуктивной системы животных - необходимая предпосылка для изучения механизмов регуляции гаметогенеза. В ходе нашей работы было впервые детально описано строение сети семенника на последовательных стадиях эмбриогенеза мыши и реконструирован ход её нормального развития. Показано, что проксимальная часть сети семенника, ближайшая к гонаде, формируется за счет трансформации клеток Сертоли половых тяжей в клетки эпителия сети семенника. Впоследствии именно эта часть эмбриональной сети семенника входит в состав интратестикулярной сети семенника и даст начало Сертоли-подобным клеткам. Ведущую роль в трансформации клеток Сертоли в клетки сети семенника, вероятно, играет транскрипционный фактор PAX8. Полученные результаты могут быть использованы для поиска методов коррекции нарушений сперматогенеза и терапии мужского бесплодия. Были продолжены исследования механизмов влияния серотонина и флуоксетина на функциональное состояние компонентов овариального фолликула в условиях органотипической культуры яичников мыши. Нами выявлены локальные, на уровне яичника, эффекты серотонина на экспрессию ряда генов, которые в большинстве случаев отменяются флуоксетином, а значит, зависят от активности транспортера серотонина Sert. В том числе, выявлен Sert-зависимый эффект серотонина на экспрессию Cyp19a1, Ptgs2 и Igfbp4. По всей вероятности, серотонин регулирует экспрессию ароматазы в клетках гранулезы, причем данный эффект опосредован активностью Sert и реализуется с участием внефолликулярных компонентов яичника.

В ходе изучения механизмов устойчивости процессов развития на субклеточном уровне была проверена гипотеза о вовлеченности донервных трансмиттеров в регуляцию перестроек цитоскелета. Серотонин и дофамин известны как донервные трансмиттеры, выполняющие регуляторные функции в эмбриогенезе. На модели раннего эмбриона морского ежа показано, что цитостатический эффект антагонистов рецепторов дофамина и серотонина связан с их влиянием на элементы цитоскелета. Оба антагониста вызывают увеличение

степени полимеризации актинового цитоскелета, причем эффект наблюдается как в кортикальном слое, так и в цитоплазме. Кроме того, оба антагониста влияют на тубулиновый причем галоперидол преимущественно цитоскелет, если вызывает нарушения пространственной организации веретена деления, то ципрогептадин приводит к полной деполимеризации тубулина и прекращению митотических процессов. Показано, что структурная стабильность молекул цитоскелета - важнейший механизм, обеспечивающий устойчивость процессов развития скелетных и сердечной мышц млекопитающих. Исследована роль структурной стабильности тропомиозина (ТПМ) в происхождении различных миопатий человека, таких как тяжелые наследственные гипертрофические или дилатационные кардиомиопатии. Изучено влияние мутаций S283D и S61D, имитирующих фосфорилирование ТПМ, на структурно - функциональные свойства сердечного ТПМ. Показано, что мутация S61D вызывает значительную дестабилизацию N-концевой части молекулы ТПМ. Выявлен механизм развития немалиновой миопатии, ассоциированной с мутацией M9R. На молекулярном уровне установлен механизм развития миопатии, ассоциированной с мутацией К169Е. Кроме того, мы описали структурно-функциональные свойства димеров Трт с мутацией Е151А. Результатом этой замены является менее плотная укладка молекул в микрофиламенте, что обуславливает развитие генерализованной мышечной слабости.

Механизмы устойчивости морфогенезов нормального развития на клеточном и молекулярно-генетическом уровне выполнялось на эмбрионах двух видов книдарий (Cnidaria): Clytia hemisphaerica и Lucernaria quadricornis. Оба вида формируют эндодерму с эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Сравнительный помощью анализ показывает, что основные черты эмбриональных ЕМТ являются общими для Cnidaria и Bilateria, и могут быть прослежены до корней филогенетического дерева Metazoa. Для изученных видов книдарий мы реконструировали обратную связь между изменением формы клеток, их поведением, и формой эмбриона. Показано, что ЕМТ не только обеспечивает материал для формирования эндодермального зародышевого листка. Мезенхимальные клетки презумптивной эндодермы генерирует силы, которые меняют форму эмбриона в процессе морфологической дифференцировки оси тела личинки. Мы подтвердили, что "глобальный контроль" морфогенетических процессов полем механических напряжений - один из наиболее древних механизмов поддержания устойчивости развивающейся системы.

88

Регуляция онтогенеза на организменном уровне изучалась на примере биоритмов роста и потребления кислорода у моллюсков, а также ответа эмбриона позвоночных на понижение уровня кислорода в среде.

В онтогенезе двух видов моллюсков ростовые процессы и энергетический обмен были исследованы экспериментальными и математическими методами. Проведено изучение индивидуального линейного роста в двух популяциях пресноводной жемчужницы Margaritifera margaritifera. Оказалось, что рост каждого моллюска сопровождается тремя регулярными биоритмами, причем первые два биоритма затухают, а последний имеет постоянную амплитуду. Периоды биоритмов были практически постоянными как в онтогенезе каждой особи, так и при сравнении особей в популяции. Низкочастотный биоритм с периодом 13,4 года имеет экзогенную природу и опосредован колебаниями условий среды. Остальные два биоритма являются эндогенными и не связаны с периодическими процессами в окружающей среде. В онтогенезе Planorbarius corneus было выявлено два эндогенных биоритма интенсивности потребления кислорода с периодами 10.8 и 4.7 недель. Локальные экстремумы биоритмов у разных особей приходятся на одни и те же возраста, а их периоды приблизительно одинаковы у всех особей и остаются неизменными на протяжении онтогенеза. Наличие двух ритмов интенсивности потребления кислорода находится в соответствии с выводами термодинамики нелинейных систем и свидетельствует об эндогенной природе биоритмов.

Проведено исследование влияния недостатка кислорода (острой гипоксии) на работу сердечнососудистой системы раннего эмбриона курицы. Показано, что способность частично поддерживать частоту сердечных сокращений (ЧСС) на фоне гипоксии регулируется на организменном уровне, и эта способность отсутствует у изолированного сердца. Так, у изолированного сердца (*in vitro*), 1) ингибиторный гипоксический эффект на ЧСС был сильнее по сравнению с экспериментами *in ovo*; 2) фаза восстановления ЧСС на фоне гипоксии вершут ЧСС; 4) ЧСС после гипоксии восстановления после гипоксии не наблюдали овершут ЧСС; 4) ЧСС после гипоксии восстанавливался частично. Эти данные показывают, что некоторые факторы, присутствующие в яйце, такие как, катехоламины, могут иметь решающее значение для гипоксии переключение паттерна ЧСС между более высокой и низкой частотой, связано с прямым воздействием гипоксии на сердечные миоциты и на активность синоатриальных пейсмекерных клеток сердца.

89

В 2020 году по данной теме всего 12 публикаций, из них 7 – отчетные публикации в рамках выполнения Государственного задания.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2020 ГОД

## \*отчетные публикации

\*<u>Kulibin A.Yu., Malolina E.A.</u> Formation of the rete testis during mouse embryonic development // Developmental Dynamics. – 2020. – Vol. 249. – Is. 12. – P. 1486-1499. DOI: 10.1002/dvdy.242. – Q1.

2. \*<u>Nikishin D.A.</u>, <u>Malchenko L.A.</u>, Milosevic I., Rakic L., <u>Shmukler Y.B.</u> Effects of Haloperidol and Cyproheptadine on the Cytoskeleton of the Sea Urchin Embryos//Biologicheskie Membrany. – 2020. – Vol. 37. – N2. – P. 120-125. DOI: 10.31857/S0233475520020085. – Q4.

3. van der Sande M., <u>Kraus Y</u>., Houliston E., Kaandorp J. A cell-based boundary model of gastrulation by unipolar ingression in the hydrozoan cnidarian Clytia hemisphaerica//Developmental Biology. – 2020. – Vol. 460. – Is. 2. – P. 176-186. DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.12.012. – Q2

4. \*<u>Kraus Yu.</u>, Chevalier S., Houliston E. Cell shape changes during larval body plan development in Clytia hemisphaerica//Developmental Biology. – 2020. – Vol. 468. – P. 59–79. DOI: 10.1016/j.ydbio.2020.09.013. – Q2.

5. \*Mayorova T.D., Osadchenko B., <u>Kraus Y.</u> How to build a larval body with less than a hundred cells? Insights from the early development of a stalked jellyfish (Staurozoa, Cnidaria)//Organisms Diversity & Evolution. – 2020. – Vol. 20. – Is. 4. – P. 681-699. DOI: 10.1007/s13127-020-00459-8. – Q1.

<u>Zotin A.A.</u> Growth Biorhythms of the European Pearl Mussel Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae) of the Varzuga River Population (Murmansk Oblast)//Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – Is. 4. – P. 381-388. DOI: 10.1134/S1062359020030115. – Q4.

7. <u>\*Zotin A.A.</u>, Murzina S.A., Filippova K.A., Ieshko E.P. Growth parameters of the freshwater pearl mussel Margaritifera Margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae), Vuokinjoki river population (Karelia)//Malacologia. – 2020. – Vol. 63. – No 1. – P. 67-75. DOI: 10.4002/040.063.0107. – Q1.

8. Zotin A.A. Endogenous Biorhythms of Mass Specific Rate of Oxygen Consumption in Planorbarius corneus (Planorbidae, Gastropoda) Individual Development//Russian Journal Of Developmental Biology– 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 255-260. DOI: 10.1134/S1062360420040098. – Q4.

9. \*<u>Nechaeva M., Alekseeva T.,</u> Dobretsov, M., Kubasov I. Chicken embryos can maintain heart rate during hypoxia on day 4 of incubation // Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. – 2020. – Vol. 190. – Is. 3. – P. 361-370. DOI: 10.1007/s00360-020-01274-5. – Q1. 10. \*Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Pivovarova A.V., <u>Kleymenov S.Y.</u>, Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosin TPM3 gene//FASEB Journal. – 2020. – Vol. 34. – Is. 10. – P. 13507-13520. DOI: 10.1096/fj.202001318. – Q1.

11. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Shubin V.V., <u>Kleymenov S.Y.</u>, Kurganov , B.I. Effect of arginine on stability and aggregation of muscle glycogen phosphorylase b//International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 165. – P. 365-374. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.101. - Q1.

12. Nefedova V.V., Koubassova N.A., Borzova V.A., <u>Kleymenov S.Y.</u>, Tsaturyan A.K., Levitsky D.I. Tropomyosin pseudo-phosphorylation can rescue the effects of cardiomyopathy-associated mutations International//International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – S0141-8130(20)34855-8. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.201. – Q1.

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