

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 0088-2021-0009

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490128-8

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



«28» декабря 2021 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОНТОГЕНЕЗА: ГАМЕТОГЕНЕЗ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ И
РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ЖИВОТНЫХ
(промежуточный)

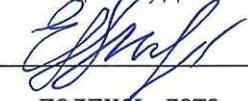
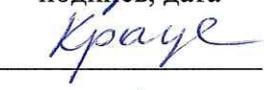
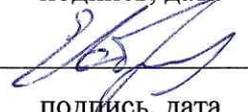
Руководитель НИР,
заведующий лабораторией,
доктор биологических наук,
профессор


28.12.2021
подпись, дата

Н.Д. Озернюк

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий лабораторией, доктор биологических наук, профессор	 _____	Н.Д. Озернюк (раздел 4) 28.12.21.
Исполнители:		
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	А.Ю. Кулибин (раздел 1) 28.12.21
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	Д.А. Никишин (раздел 2) подпись, дата
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 _____	Ю.Б. Шмуклер (раздел 2) подпись, дата
Заместитель директора по науке, кандидат биологических наук	 _____	Ю.А. Краус (Введение, раздел 3) 28.12.21.
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	С.В. Кремнёв (раздел 3) 28.12.21
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 _____	А.В. Ересковский (раздел 3) 28.12.2021
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 _____	А.А. Зотин (раздел 4) подпись, дата
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	М.В. Нечаева (раздел 4) подпись, дата
Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	С.Ю. Клейменов (раздел 4) подпись, дата
Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук	 _____	Е.Б. Абрамова 28.12.21.

РЕФЕРАТ

Отчет - 106 с., 4 разд., 28 - рис., 5 - табл., 116 - источников, 15 - отчетных публикаций.

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ РАЗВИТИЯ, ГАМЕТОГЕНЕЗ, СПЕРМИОГЕНЕЗ, СЕРОТОНИН, Фолликулогенез, Морфогенез, План строения, Рост, Энергетический обмен, Регуляция развития, Гипоксия, Структурная стабильность белков

Цель работы - выявить механизмы регуляции онтогенеза животных на разных этапах развития и на разных уровнях организации. Исследование выполнялось на широком круге объектов (эмбрионы кишечнополостных, губки, моллюски, эмбрионы позвоночных), позволяющих охарактеризовать механизмы регуляции гаметогенеза, эмбрионального и постэмбрионального развития, с использованием подходов морфологии, экспериментальной, эволюционной и экологической биологии развития, клеточной и молекулярной биологии.

Изучено развитие репродуктивной системы млекопитающих. Показана роль тиреоидного гормона трийодтиронин и фолликулостимулирующего гормона в регуляции дифференцировки Сертоли-подобных клеток эпителия сети семенника. Выявлены последствия снижения уровня обоих гормонов для развития сети семенника. Охарактеризованы эффекты серотонина на экспрессию генов-показателей функциональной активности клеток гранулезы и ооцитарного фактора роста *Gdf9*. Установлено, что они опосредованы активностью специфического транспортера серотонина SERT.

Эволюция клеточных и молекулярных механизмов развития и регенерации изучалась на представителях базальных Metazoa и позвоночных. Была показана эволюционно-консервативная роль сигнальных каскадов cWnt и TGF-beta в молекулярной разметке плана строения. Выявлены эволюционно-консервативные и специфичные для таксонов клеточные механизмы морфогенезов. Предложена оригинальная концепция взрослых стволовых клеток и их роли в развитии и регенерации беспозвоночных животных. Охарактеризована роль планарной интеркаляции клеток в поддержании механической стабильности гастрюляционных морфогенезов.

Изучались механизмы поддержания гомеостаза развивающегося организма при воздействии повреждающих факторов среды. Показано, что специфические периоды ответа эмбриона птицы на гипоксию связаны с развитием сердечно-сосудистой и дыхательной системы. Выявлена связь ритма удельной скорости роста пресноводных моллюсков с периодом в 6 лет со среднегодовой температурой места обитания популяции. Обнаружены

различия между изоформами тропомиозина позвоночных, различающимися термостабильностью, играющие ключевую роль в стабилизации цитоскелета.

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	12
РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК В МУЖСКИХ ГОНАДАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	12
1.1 Введение.....	12
1.2 Материалы и методы.....	14
1.3 Результаты и обсуждение.....	16
1.4 Заключение.....	25
1.5 Список использованных источников.....	26
РАЗДЕЛ 2. ТРАНСМИТТЕРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА.....	28
2.1 Введение.....	28
2.2 Материалы и методы.....	29
2.3 Результаты и обсуждение.....	31
2.4 Заключение.....	37
2.5 Список использованных источников.....	37
РАЗДЕЛ 3. ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ	40
3.1 Введение.....	40
3.2 Материалы и методы.....	41
3.3 Результаты и обсуждение.....	47
3.4 Заключение.....	66
3.5 Список использованных источников.....	68
РАЗДЕЛ 4. МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ГОМЕОСТАЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ОРГАНИЗМА	71
Общее введение.....	71
Подраздел 4.1 Влияние факторов среды на физиологические параметры развивающегося организма.....	72

4.1.1 Введение.....	72
4.1.2 Материалы и методы.....	73
4.1.3 Результаты и обсуждение.....	74
4.1.4 Заключение.....	78
4.1.5 Список использованных источников.....	79
Подраздел 4.2 Изучение структурных и функциональных особенностей тропомиозинов, влияющих на строение и функционирование этих белков сократительного комплекса	81
4.2.1 Введение.....	81
4.2.2 Материалы и методы.....	83
4.2.3 Результаты и обсуждение.....	85
4.2.4 Заключение.....	91
4.2.5 Список использованных источников.....	91
Подраздел 4.3 Динамика энергетического метаболизма и роста в онтогенезе животных	94
4.3.1 Введение.....	94
4.3.2 Материалы и методы.....	95
4.3.3 Результаты и обсуждение.....	97
4.3.4 Заключение.....	99
4.3.5 Список использованных источников.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ	104

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете используются следующие обозначения и сокращения

5HT – 5-гидрокситриптамин, серотонин

AMH - Анти-Мюллеров гормон

CDH1 – E-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

dpd - дни после диссоциации

EdU - 5-Этинил-2'-дезоксинуридин

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

EMT - эпителиально-мезенхимальный переход

FLU – флуоксетин

FOXJ2 - Forkhead box L2

FSW - профильтрованная морская вода

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

hpd - часы после диссоциации

hpf - часы после оплодотворения

HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

MMR - Marc's Modified Ringer

NRQ – нормированное относительная экспрессия

PAX8 – член семейства Paired box gene транскрипционных факторов

PBS – натрий-фосфатный буфер

PBST - PBS и 0,01% тритона X100

PCP - планарная поляриность клеток

PFA - параформальдегид

PTw - PBS и 0,1% Tween

SF1 – стероидогенный фактор 1

SOX9 – SRY-Box транскрипционный фактор 9

SRY - фактор азооспермии, регион Y-хромосомы, определяющий пол

T₃ – трийодтиронин

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling,

WT1 – белок опухоли Вилмса 1

БСС – бессывороточная среда

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ВСК - взрослые стволовые клетки

ДСК - метод дифференциальной сканирующей калориметрии

ЕА – единица активности

КД - метод кругового дихроизма

КЛСМ - конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

МЕТ - мезенхимо-эпителиальный переход

ПРТ - полная регенерация тела

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СИОЗС - селективные ингибиторы обратного захвата серотонина

СПК - Сертоли-подобные клетки

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ТН - тропонин

ТПМ - тропомиозин

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЧСС - частота сердечных сокращений

ВВЕДЕНИЕ

Выявление фундаментальных механизмов регуляции онтогенеза, обеспечивающих устойчивость развивающейся системы – одна из важнейших задач современной биологии развития. Уникальность данного исследования состоит в использовании широкого круга модельных объектов от базальных многоклеточных до позвоночных животных. Кроме того, исследование объединяет последовательные этапы онтогенеза, от гаметогенеза до постнатального развития, и уровни организации, от молекулярного и клеточного до организменного.

Изучение развития, строения и работы мужской и женской репродуктивной системы животных необходимо для понимания механизмов регуляции и эволюции процессов гаметогенеза. Эти исследования имеют наряду с фундаментальным и потенциальное прикладное значение. Была продолжена серия работ 2016-2020 гг., посвященная изучению Сертоли-подобных клеток (СПК), которые находятся в эпителии сети семенника, системы взаимосвязанных каналов и полостей, соединяющих семенник с выносящими канальцами и служащих для транспорта сперматозоидов из мужской гонады. СПК близки к клеткам Сертоли, поддерживающим клеткам сперматогенной системы, по происхождению и по транскриптому, и подходят для применения в клеточных технологиях, но многие аспекты их биологии все еще плохо изучены. В 2021 г. была исследована дифференцировка СПК в постнатальном развитии и установлено, какую роль в этом процессе играют тиреоидный гормон трийодтиронин и фолликулостимулирующий гормон.

Нормальное функционирование женской половой системы зависит от сигнального пути нейромедиатора серотонина. Мы продолжили исследование роли серотонина в регуляции функциональной активности клеточных компонентов яичника млекопитающих. В экспериментах на культуре изолированных овариальных фолликулов изучались эффекты серотонина на экспрессию нескольких генов-показателей функциональной активности клеток гранулезы (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Igfbp* и *Ihh*), а также важнейшего ооцитарного фактора роста *Gdf9*.

Изучение разнообразия и эволюционной истории молекулярно-генетических и клеточных механизмов регуляции морфогенетических процессов важно для понимания причин и последствий нарушений развития, приводящих к тяжелым врожденным патологиям. Представители базальных Metazoa, кишечнополостные (тип Cnidaria) и губки (тип Porifera), сохранили эволюционно первичные механизмы регуляции морфогенезов, что делает их изучение очень информативным. Работа была сфокусирована на изучении

клеточных и молекулярных механизмов в эмбриогенеза гидроида *Dynamena pumila* и в развитии агрегата диссоциированных клеток губки *Halisarca dujardini*. Изучали вовлеченность высоко консервативных сигнальных каскадов Wnt и TGF-beta в разметку плана строения (осевой паттернинг), детально описывали поведение клеток, их пролиферацию и ультраструктуру в ходе формирования первичной оси тела модельных объектов. Была также проведен анализ роли взрослых стволовых клеток в регенерации тела и поддержании его гомеостаза у взрослых губок.

Регуляция морфогенетических процессов за счет физического фактора - конфигурации поля механических напряжений - изучалась на модели гаструляции амфибии *Xenopus laevis*. Мы сфокусировали исследование на регистрации и математическом описании индивидуальных траекторий движения клеток супрабластопоральной области эмбриона. Была поставлена задача охарактеризовать роль интеркаляционных движений клеток в поддержании механической стабильности гаструляционных морфогенезов.

Влияние факторов среды на физиологические параметры развивающегося организма изучалось на двух моделях: эмбрионах позвоночного (птицы), развивающегося в условиях гипоксии; личинках амфибий из разных популяций, развивающихся в контролируемых лабораторных условиях. Воздействие гипоксических условий во время эмбриогенеза - повреждающий фактор, влияющий на рост и развитие эмбриона, уровень эмбриональной смертности, многие аспекты жизни взрослого организма. Куриный эмбрион - удобная экспериментальной модели, где поступление кислорода к эмбриону не зависит от физиологии матери. В исследовании был сделан акцент на острой гипоксии и связанной с ней физиологической реакции эмбриона, так как именно эта проблема до сих пор оставалась недостаточно изученной.

Один из важнейших механизмов регуляции онтогенеза на организменном уровне - биоритмы. На обширном материале, собранном из разных популяций пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* L северо-запада России изучались ритмы удельной скорости роста и их связь с условиями местообитания моллюсков.

Устойчивость процессов развития на клеточном и субклеточном уровне часто зависит от эффективной регуляции перестроек цитоскелета и структурной стабильности образующих его молекул. Структурная стабильность молекул цитоскелета изучалась на примере тропомиозина (Tpm). 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 ряда тяжелых

наследственных заболеваний. Задачей исследования было изучение последствий мутаций R91P и R245G в димере $\gamma\gamma$ -Тpm для взаимодействия F-актина с медленным миозином в присутствии медленного мышечного тропонина.

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

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1 ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК В МУЖСКИХ ГОНАДАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1.1 Введение

Мужские гонады млекопитающих, семенники, состоят из извитых семенных канальцев и интерстициальной ткани между ними. В семенных канальцах проходит сперматогенез: дифференцировка половых клеток до мужских гамет, сперматозоидов. Этот процесс поддерживают соматические клетки семенных канальцев, клетки Сертоли, обеспечивающие половые клетки питательными веществами и ростовыми факторами, а также выполняющие структурную, иммуносупрессивную, фагоцитирующую и ряд других функций (рисунок 1.1 А, Б). Клетки Сертоли пролиферируют в эмбриональном и раннем постнатальном развитии, но к моменту достижения половой зрелости останавливают клеточные деления и дифференцируются, являясь одним из примеров невозобновляемых клеточных популяций.

В серии работ 2016-2020-х гг. [1-3] нами была найдена и охарактеризована еще одна популяция поддерживающих соматических клеток, близкая к клеткам Сертоли по происхождению. Это Сертоли-подобные клетки (СПК), которые локализуются в эпителии сети семенника *rete testis*, системы взаимосвязанных каналов и полостей, соединяющих семенник с выносящими канальцами и служащих для транспорта сперматозоидов из гонады в придаток семенника - эпидидимис (рисунок 1.1 А, Б). По крайней мере, часть клеток *rete testis* формируется рано, на стадии бипотенциальной гонады, из клеток-предшественников соматических клеток гонады [4]. Кроме того, по нашим данным [3], другая часть клеток сети семенника может обособливаться позднее и происходить непосредственно от эмбриональных клеток Сертоли.

Как и клетки Сертоли, СПК дифференцируются к моменту достижения половозрелости: у них исчезает экспрессия части генов-маркеров клеток Сертоли, и они выходят из клеточного цикла [2]. Однако эти события не являются необратимыми, и СПК способны к дедифференцировке в условиях культуры, при этом приближаясь по своим свойствам к недифференцированным клеткам Сертоли неонатальных организмов [1, 2]. Это делает изучение СПК и *rete testis* интересным не только с фундаментальной точки зрения, но также и с прикладной: эти клетки могут быть использованы в 2D и 3D *in vitro* системах для имитации сперматогенеза [2, 5].

Целью настоящей работы стало изучение факторов, определяющих дифференцировку СПК в постнатальном развитии мыши. В качестве маркеров дифференцировки были выбраны пролиферационная активность и экспрессия *Dmrt1*, ключевого транскрипционного фактора клеток Сертоли [6], который также присутствует в части недифференцированных клеток сети семенника и исчезает при их дифференцировке [2]. Было изучено действие на дифференцировку СПК двух основных гормонов, управляющих созреванием мужской гонады и дифференцировкой клеток Сертоли: тиреоидного гормона трийодтиронина (T_3) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ).

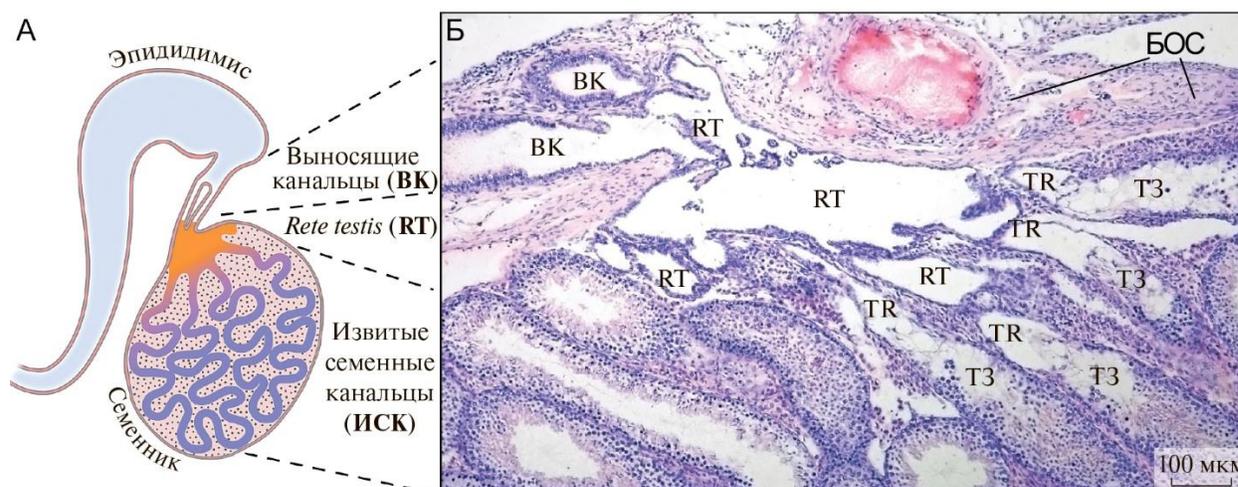


Рисунок 1.1 - Строение семенника мыши и сети семенника (*rete testis*)

А – схема строения семенника взрослой мыши с выносящими канальцами и эпидидимисом. Извитые семенные канальцы представляют собой дугу, обоими концами соединяющуюся с сетью семенника. Снаружи канальцы окружены интерстициальной тканью. Б – срез семенника половозрелой мыши в области сети семенника, окраска гематоксилин-эозином. Обозначения: БОС – белочная оболочка семенника, ВК – выносящие канальцы, RT – сеть семенника (*rete testis*), TR – прямые канальцы (*tubuli recti*), ТЗ – транзиторные зоны. Рисунок взят из статьи [7] и представлен здесь с небольшими изменениями.

По данным ВОЗ, за последние 20 лет доля мужской infertility увеличилась с 8-10% до 30-40% всех случаев бесплодия [8]. Эта тенденция во многом способствовала развитию методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и криоконсервации гамет. В рамках отчета за 2021 год рассмотрены вопросы о правовом регулировании и этических принципах функционирования криобиобанков.

1.2 Материалы и методы

В работе были использованы самцы-мышата линии C57Bl/6. 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.

Клеточные культуры получали из семенников 6-суточных мышат. Для этого фрагменты ткани инкубировали последовательно: 20 мин в смеси коллагеназы IV типа (3 мг/мл) и ДНКазы I типа (0,1 мг/мл, Sigma) и два раза в смеси гиалуронидазы (2мг/мл, Sigma) и ДНКазы, 20 мин во втором и 40 мин в последнем переваре. Клетки культивировали в культуральных планшетах, покрытых матригелем (Corning), при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher) с пируватом натрия (Sigma), инсулин/трансферрин/селенитом (ITS, Thermo Fisher) и пенициллин/стрептомицином (Пан-Эко), но без добавления сыворотки (далее по тексту бессывороточная среда – БСС). К части культур добавляли гормоны Т₃ (0.2 мкМ, Sigma) и ФСГ (0.39МЕ/мл, Organon). За 2 ч до фиксации к культурам добавляли EdU (Thermo Fisher).

Для получения чистой культуры СПК суспензии клеток предварительно окрашивали антителами к CDH1 (Biolegend, # 147304), маркеру клеток сети семенника и недифференцированных сперматогониев. Далее проводили клеточный сортинг на BioRad S3e Cell Sorter и культивировали фракции CDH1⁺ и CDH1⁻ клеток на БСС с добавлением 1% FBS (HyClone) и комплекса низкомолекулярных ингибиторов: YAC – Y-27632 (10 мкМ; Abcam), A-83-01 (0.5 мкМ; Sigma) и CHIR99021 (3 мкМ; Sigma), необходимых для поддержания экспрессии Dmrt1 в СПК [9]. За 5 сут половые клетки исчезали из культуры, и фракция CDH1⁺ клеток более чем на 98% состояла из СПК. Во фракции CDH1⁻ клеток находились клетки Сертоли и перитубулярно-мышечные клетки.

Из этих культуральных образцов выделяли тотальную РНК с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen) по протоколу производителя, в процессе проводили ДНКазную обработку образцов (Pure Link). Далее получали библиотеки кДНК при помощи MMLV RT kit (Евроген). ОТ-ПЦР реакцию проводили на амплификаторе Mj Mini Personal Thermal Cycler (Bio-rad, США) с использованием реактивов Screen Mix-HS (Евроген) и праймеров

(Евроген, таблица 1.1). В качестве референс-гена использовали Hprt. Анализ результатов проводили с помощью электрофореза продуктов ПЦР реакции в 2% агарозном геле.

Таблица 1.1 - Праймеры для ПЦР анализа экспрессии рецепторов к гормонам Т₃ и ФСГ

Название праймера	Forward	Reverse	Размер ПЦР продукта, bp
Hprt	GCAGTACAGCCCCAAAATGG	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	50
Thra	GGACCTGATACATGTTGCTA	GACTTTCATGTGGAGGAAGC	252
Thrb	TTGGGGTGGTTTCAGATGCC	CATGGTGCTTCCGGTAATTGATA	206
Fshr	CCTTGCTCCTGGTCTCCTTG	CTCGGTACCTTGCTATCTTG	113

Для получения органной культуры от семенников 6-суточных мышей отделяли небольшие фрагменты, содержащие *rete testis* с прилежащей к ней оболочкой семенника. Эти фрагменты переносили на фильтры Nucleopore (Sigma), которые в свою очередь помещали в культуральные планшеты на поверхность БСС. Образцы фиксировали через 3 сут. EdU добавляли за 3 ч до фиксации.

Клеточные культуры фиксировали 12 мин в 4%-ном параформальдегиде, промывали в PBS, помещали в блокирующий раствор (3% BSA, 0.1% Tween 20, 0.5% Triton X-100 в PBS, Sigma) на 30 мин при 37°C и инкубировали с первичными антителами к PAX8 (1:300, Thermo Fisher, MA5-32382) ночь при 4°C и с первичными антителами к DMRT1 (1:50, Santa Cruz, sc-377167) – 1 ч при 37°C. Культуры промывали в PBS и окрашивали вторичными антителами с конъюгированной флуоресцентной меткой (1:500, Thermo Fisher, A-2120, A-31571). EdU метку выявляли с помощью набора Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit (Thermo Fisher, C10338). Ядра окрашивали DAPI.

Образцы органной культуры и семенники интактных мышат 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 50 мин. Срезы промывали в PBS, помещали в блокирующий раствор (3% BSA, 0.1% Tween 20, 0.1% Triton X-100 в PBS) на 30 мин при 37°C и далее инкубировали 1 ч в растворе первичных антител к активированной каспазе-3 (1:500, Sigma, C8487) или к SOX9 (1:200, Millipore, AB5535) и, для части образцов, CDH1 (1:20, BD Biosciences, # 560064 или 560062, с флуоресцентной меткой) при 37°C. После промывки в

PBS срезы помещали в раствор вторичных антител, конъюгированных с AF 594 (1:500, Thermo Fisher, A-21207), на 30 мин при 37°C. Далее срезы окрашивали антителами к DMRT1 или к CDH1 (1:200, BD Biosciences, # 610182), используя M.O.M. Fitc Kit (FMK-2201, Vector Laboratories). Для визуализации ядер срезы докрасивали DRAQ5 (1:1000, Thermo Fisher) или Sytox Orange (1:50000, Thermo Fisher). На контрольных срезах, к которым не добавляли первичные антитела или добавляли контрольные изотипные антитела, окраски не наблюдали. EdU метку выявляли с помощью набора Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit (Thermo Fisher, C10338).

Парафиновые срезы фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5, а клеточные культуры – на эпифлуоресцентном микроскопе Leica DMI6000. Обработку изображений и количественный анализ проводили в программах ImageJ и CellProfiler. Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз. Все количественные данные представляли в виде: среднее±стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни.

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Изучение процессов дифференцировки и дедифференцировки клеток Сертоли мышы

Созревание семенника в постнатальном развитии во многом определяется созреванием клеток Сертоли, которые далее воздействуют на половые клетки и другие соматические клетки семенника, вызывая их дифференцировку. Ключевой гормон, регулирующий этот процесс – Т₃. Он воздействует на клетки Сертоли непосредственно, снижая их пролиферацию и экспрессию недифференцированных маркеров (таких как анти-Мюллеров гормон АМН) и усиливая экспрессию дифференцированных маркеров (например, рецептора к андрогену) [10]. ФСГ – еще один гормон, действующий непосредственно на клетки Сертоли и важный для их правильного функционирования, он по-разному воздействует на недифференцированные и дифференцированные клетки, стимулируя пролиферацию у первых и подавляя ее у вторых [10].

Воздействуют ли эти гормоны на *rete testis* и СПК и если воздействуют, то каким образом, было неизвестно. Ранее нами были проведены эксперименты, моделирующие системный гипертиреоз и гипотиреоз у мышей. Они показали, что повышение уровня Т₃ у неполовозрелых животных ускоряет дифференцировку СПК. Однако изменения концентрации Т₃ воздействуют на секрецию других гормонов, которые, в свою очередь, могли влиять на СПК. Если же все-таки

это действие непосредственно T_3 , то неясно, действует ли он на СПК непосредственно или косвенно, через клетки Сертоли. Экспериментов по воздействию ФСГ на СПК неполовозрелых животных ранее не проводилось.

Сначала мы изучили экспрессию рецепторов к T_3 и ФСГ в СПК методом ПЦР. Для этого были использованы чистые культуры СПК, полученные от 6-суточных мышат и размноженные в культуре в течение 5 сут. В качестве контроля использовали смешанные культуры недифференцированных клеток Сертоли и перитубулярно-мышечных клеток, выделенные из мышат того же возраста и культивировавшиеся при тех же условиях. Клетки Сертоли в смешанных культурах экспрессировали рецептор к ФСГ (*Fshr*), а также тиреоидный рецептор альфа (*Thra*), но не тиреоидный рецептор бета (*Thrb*) (рисунок 1.2), что соответствует данным других исследователей [10, 11]. СПК так же экспрессировали *Fshr* и *Thra*, но не *Thrb* (рисунок 1.2). Таким образом, и T_3 , и ФСГ имеют возможность непосредственно воздействовать на СПК и *rete testis*.

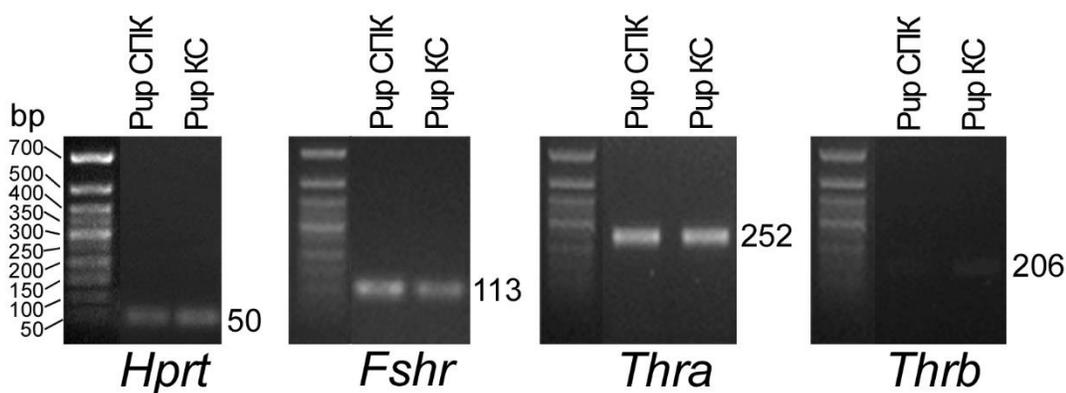


Рисунок 1.2 - Экспрессия рецепторов к гормонам T_3 и ФСГ СПК и клетками Сертоли (КС) 6-ти суточного мышонка

Далее, для того чтобы избежать влияния на семенник других гормонов, была использована методика органной культуры. Небольшие фрагменты семенников 6-суточных мышей, содержащие сеть семенника и прилежащие к ней семенные каналы, культивировали на границе фаз жидкость/газ в БСС в течение 3 сут (Сначала мы изучили экспрессию рецепторов к T_3 и ФСГ в СПК методом ПЦР. Для этого были использованы чистые культуры СПК, полученные от 6-суточных мышат и размноженные в культуре в течение 5 сут. В качестве контроля использовали смешанные культуры недифференцированных клеток Сертоли и перитубулярно-мышечных клеток, выделенные из мышат того же возраста и культивировавшиеся при тех же условиях. Клетки Сертоли в

смешанных культурах экспрессировали рецептор к ФСГ (*Fshr*), а также тиреоидный рецептор альфа (*Thra*), но не тиреоидный рецептор бета (*Thrb*) (рисунок 1.2), что соответствует данным других исследователей [10, 11]. СПК так же экспрессировали *Fshr* и *Thra*, но не *Thrb* (рисунок 1.2). Таким образом, и Т₃, и ФСГ имеют возможность непосредственно воздействовать на СПК и *rete testis*.

Далее, для того чтобы избежать влияния на семенник других гормонов, была использована методика органной культуры. Небольшие фрагменты семенников 6-суточных мышей, содержащие сеть семенника и прилежащие к ней семенные каналы, культивировали на границе фаз жидкость/газ в БСС в течение 3 сут (рисунок 1.3).

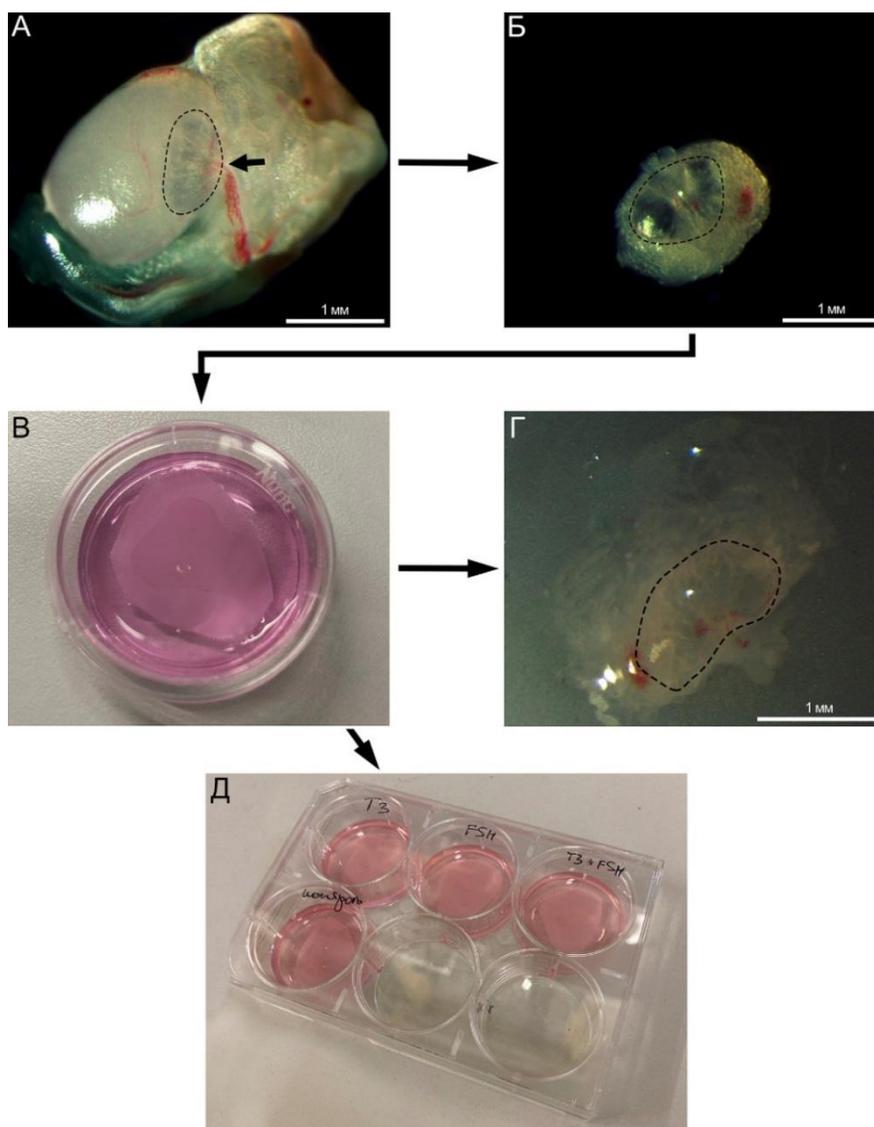


Рисунок 1.3 - Подготовка образцов ткани семенника для 3D-органной культуры
 А – семенник 6-ти суточного мышонка с эпидидимисом, здесь и далее пунктиром обозначена область сети семенника, Б – кусок семенника с сетью семенника и прилежащими к ней извитыми семенными канальцами (вид сверху со стороны выхода выносящих канальцев,

обозначено стрелкой на рис. 3А), В – образец помещали на фильтр, который плавает на поверхности среды, Г – кусочек семенника на фильтре, Д – шести луночный планшет с контрольными и опытными образцами.

Так как в таком типе культуры велик риск дегенерации ткани из-за недостаточного доступа к ней кислорода и питательных веществ, в первых экспериментах образцы окрашивали антителами к активированной каспазе-3, маркеру апоптоза. На рисунке 1.4 А видно, что только единичные клетки окрашиваются на каспазу-3 на 0 сут культивирования. На 3 сут число таких клеток увеличивается (рисунок 1.4 Б), однако это большей частью половые клетки, в сети семенника апоптоза не наблюдается. Поэтому эта методика была использована в дальнейших экспериментах.

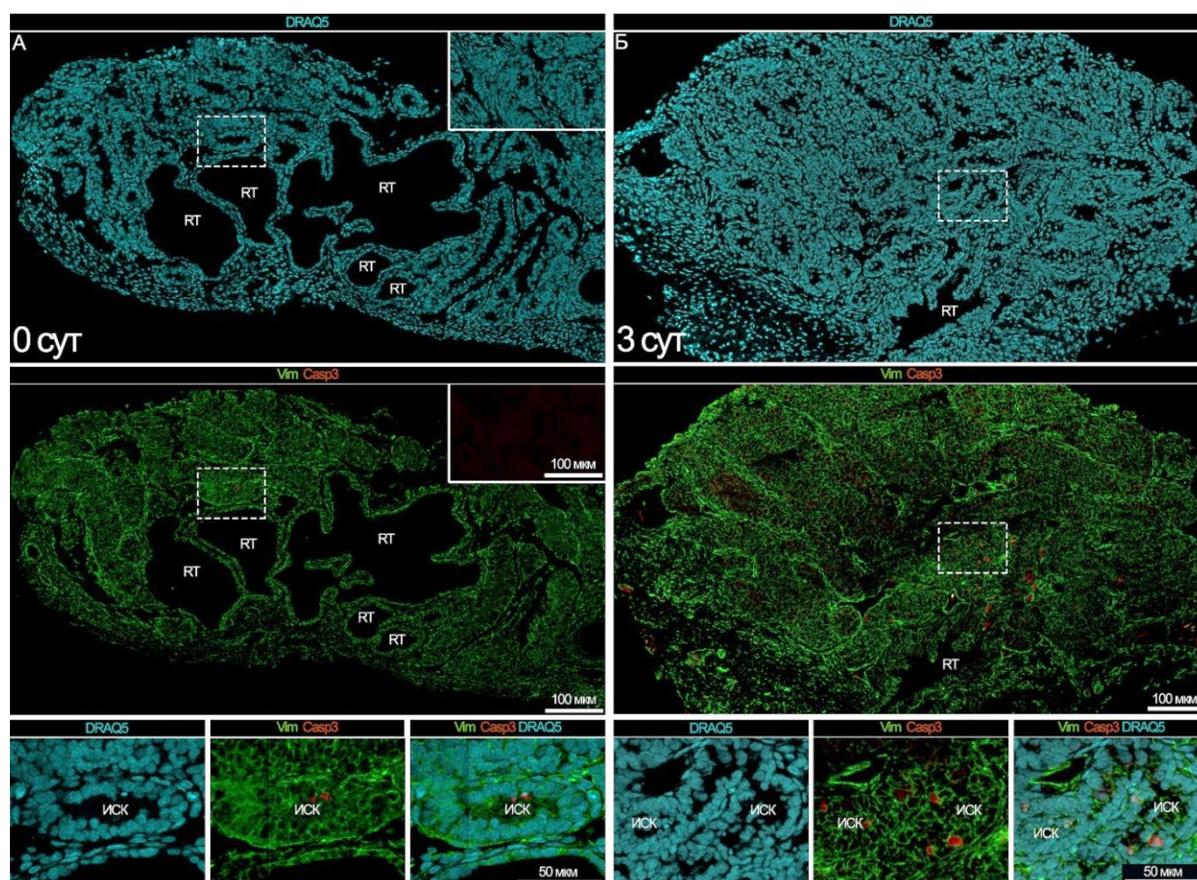


Рисунок 1.4 - Репрезентативные фотографии срезов фрагментов семенника (А) - до и (Б) - после 3-х сут культивирования в 3D-органической культуре, окрашенных на маркер соматических клеток семенника виментин (Vim) и активированную каспазу 3 (Casp3). Ядра докрашены DRAQ5. Вставка на рисунке А - изотипный контроль, пунктиром обозначены увеличенные области. Изображения на рисунках А и Б получены путем объединения нескольких смежных полей зрения.

Фрагменты семенников культивировали в среде, содержащей T₃, ФСГ или T₃ и ФСГ вместе. На 3 сут к образцам за 3 ч до фиксации добавляли аналог тимидина EdU для анализа пролиферации. Образцы окрашивали антителами к SOX9, транскрипционному фактору, экспрессирующемуся как в клетках Сертоли, так и в сети семенника [7], CDH1, маркирующему *rete testis* [7], и либо антителами к DMRT1, либо набором для выявления EdU. Примеры окрасок на контрольных образцах представлены на рисунке 1.5.

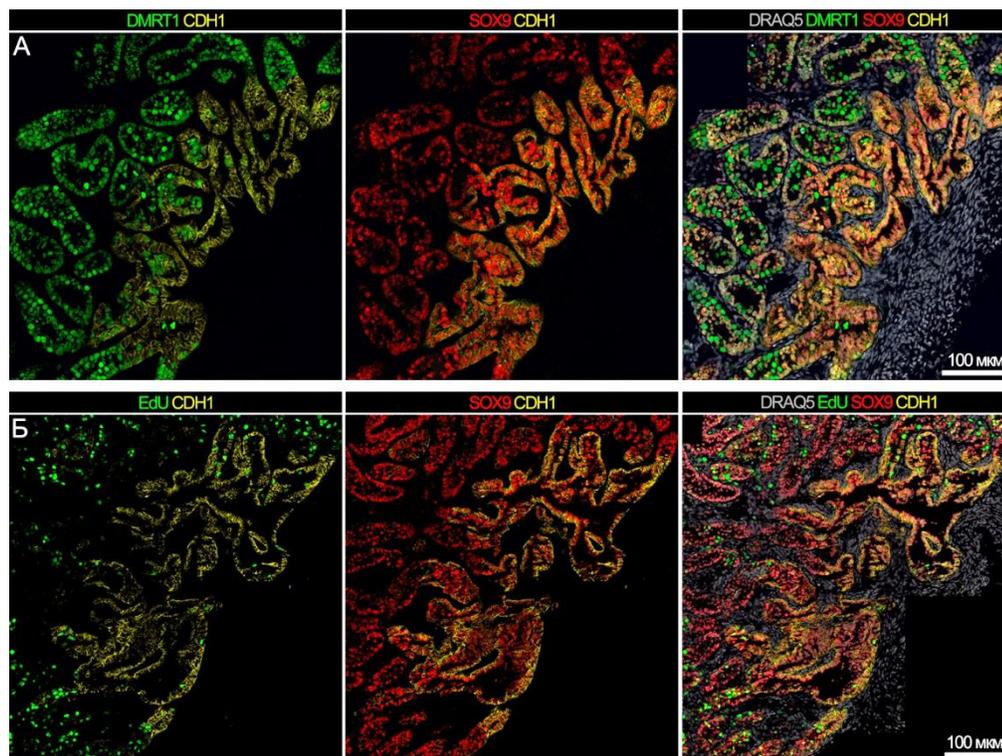


Рисунок 1.5 - Репрезентативные срезы контрольных 3D-органных культур кусочков семенника 6-ти суточных мышат

(А) - окраска на Dmrt1/Sox9/Cdh1 или (Б) - EdU/Sox9/Cdh1. Ядра докрашены DRAQ5. Изображения на рисунках А и Б получены путем объединения нескольких смежных полей зрения.

Количественный анализ образцов показал, что T₃, как и ожидалось, снижал пролиферацию клеток Сертоли, причем значительно, в 7 раз (рисунок 1.6 А). То же действие, но в меньшей степени, оказывал и ФСГ (рисунок 1.6 А), что указывает на то, что клетки Сертоли 6-суточного мышонка уже переключились на путь дифференцировки. Совместное добавление T₃ и ФСГ еще больше снижало пролиферацию, хоть и не статистически значимо по сравнению с T₃ (рисунок 1.6 А). Падение пролиферационной активности клеток Сертоли на 3 сут культуры под воздействием T₃ и T₃ и ФСГ соответствовало тому, что происходит *in vivo* в семеннике между 6 и 9 сут постнатального развития (рисунок 1.6 Б).

Клетки сети семенника в контроле пролиферировали не так активно, как клетки Сертоли (рисунок 1.6 В). Но и Т₃, и ФСГ еще больше снижали их пролиферацию, причем, в отличие от клеток Сертоли, ФСГ оказывал более выраженный эффект (рисунок 1.6 В). И это также соответствовало изменениям пролиферационной активности *rete testis in vivo* (рисунок 1.6 Г). Т₃ также в два раза снижал процент DMRT1⁺ клеток в *rete testis*, в то время как ФСГ не влиял на этот параметр (рисунок 1.6 Д). *In vivo* снижение экспрессии *Dmrt1* происходило позже: на 12 сут постнатального развития (рисунок 1.6 Е).

Таким образом, ФСГ и особенно Т₃ действительно способствуют дифференцировке клеток сети семенника, хотя скорость этого процесса *in vivo* и *ex vivo* несколько различается, что, возможно, связано с воздействием каких-то дополнительных факторов на этот процесс. Однако неясно, действуют ли эти гормоны непосредственно на клетки сети семенника. Для того чтобы это выяснить была проведена серия экспериментов на культуре клеток. Для этого фрагменты семенников 6-суточных мышат, содержащие *rete testis* и прилегающие к ней семенные каналы, обрабатывали ферментами для получения одноклеточной суспензии, высаживали в культуральные планшеты и культивировали на бессывороточной среде с Т₃, ФСГ или Т₃ и ФСГ вместе. На 3 сут, через 2 ч после добавления EdU, культуры фиксировали, окрашивали и анализировали.

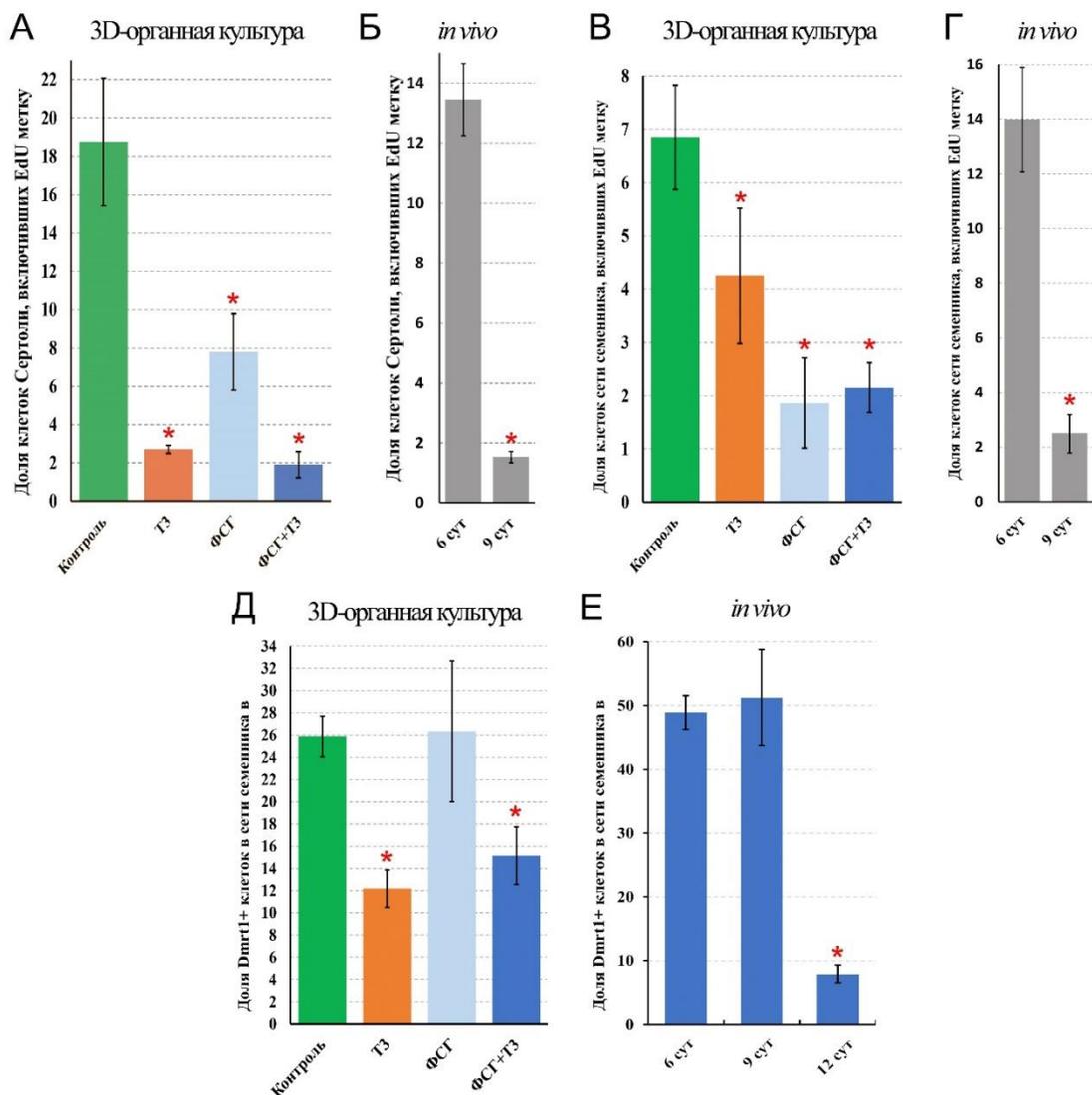


Рисунок 1.6 - Влияние гормонов T₃ и ФСГ на пролиферативную активность клеток Сертоли и клеток сети семенника в условиях 3D-органной культуры (А, В) и *in vivo* (Б, Г), а также на долю Dmrt1⁺ клеток сети семенника *in vitro* (Д) и *in vivo* (Е)

Звездочки на рисунках А, В и Д – различия с контролем статистически достоверны при $p \leq 0.05$, на Б, Г и Е – различия статистически достоверны с предыдущим сроком фиксации при $p \leq 0.05$.

В культурах присутствовали колонии СПК, идентифицируемые по окраске на PAX8, транскрипционный фактор, в семеннике экспрессирующийся исключительно в *rete testis* [7], клетки Сертоли, окрашивающиеся антителами к DMRT1, и перитубулярно-мышечные клетки оболочки семенных канальцев, которые не экспрессируют ни один из этих транскрипционных факторов. В этих условиях T₃ по-прежнему снижал пролиферацию клеток Сертоли (рисунок 1.7 А), что согласуется с данными другого исследования [12].

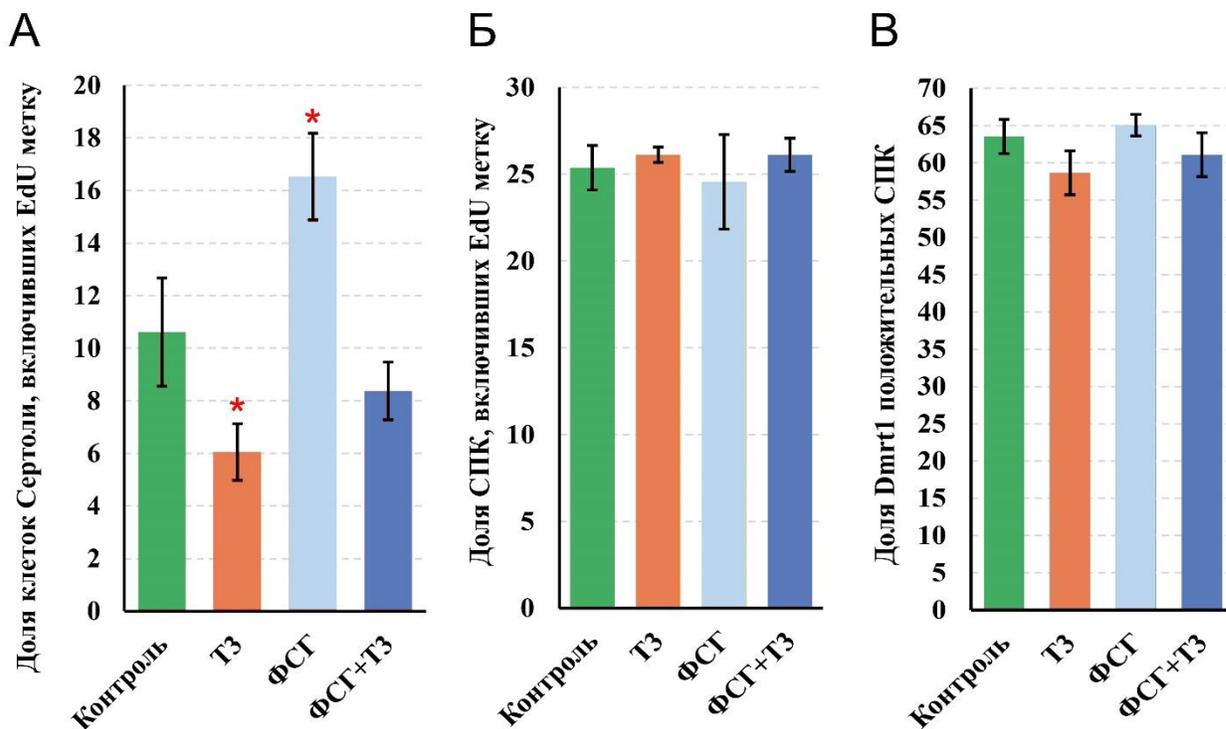


Рисунок 1.7 - Влияние гормонов T₃ и ФСГ на пролиферативную активность клеток Сертоли и СПК в условиях прикрепленной клеточной культуры (А, Б), а также на долю Dmrt1⁺ СПК (В).
* – различия с контролем статистически достоверны при p<0.05.

В то же время ФСГ повышал пролиферацию клеток Сертоли (рисунок 1.7 А), что противоположно его действию в органной культуре (рисунок 1.6 А). Это различие можно объяснить тем обстоятельством, что в клеточной культуре клетки Сертоли дольше сохраняют недифференцированное состояние, и ФСГ воздействует на них так же, как на недифференцированные клетки, то есть способствует их пролиферации. Совместное добавление T₃ и ФСГ нивелирует воздействие ФСГ на клетки Сертоли (рисунок 1.7 А). В то же время ни T₃, ни ФСГ не влияли на пролиферацию СПК в клеточной культуре (рисунок 1.7 Б), и T₃ только незначительно снижал число DMRT1⁺ клеток в колониях СПК (рисунок 1.7 В). То есть, и T₃, и ФСГ воздействуют на пролиферацию и экспрессию *Dmrt1* в сети семенника косвенно, скорее всего, через клетки Сертоли. Вероятно, играет роль и пространственная организация клеток Сертоли и СПК в семеннике, теряющаяся при их выделении в культуру клеток. Кроме того, процесс перехода клеток Сертоли в СПК, происходящий в эмбриональном развитии, может продолжаться и в постнатальном развитии [7] и вносить свой вклад в динамику дифференцировки СПК *in vivo* и в органной культуре, но не в культуре клеток.

1.3.2.Криоконсервирование гамет и его правовое регулирование

В сфере криоконсервации гамет большую важность имеет вопрос о правовом регулировании и этических принципах функционирования криобиобанков. Хотя в России данные организации пока представлены лишь единично, они активно развиваются за рубежом, и со временем эта тенденция, несомненно, будет воспринята на отечественной почве.

Замороженный (криоконсервированный) биологический материал, содержащий человеческие гаметы, либо ооциты, либо эмбрионы, хранится в, так называемых, криобиобанках. Подробная информация о том, кому этот материал принадлежит, также хранится на программных носителях в архивах данных биобанков и сетях биобанков. В результате анализа литературы, мы выделили следующие риски [13]. Технологическая реальность сегодняшнего дня такова, что доступ к информационному архиву любого криобиобанка или их сети может осуществляться по сети интернет. В свете все более усиливающихся глобальных тенденций сетевизации, цифровизации и перевода большей части или всей доступной информации о гражданах на электронные носители и в закрытые сети (которые, тем не менее, могут быть взломаны), включая цифровые медицинские карты, при которых каждому человеку будет соответствовать свой цифровой «отпечаток», потенциальный сетевой доступ к архивам криобиобанков создает угрозу сохранения тайны информации при последующем использовании во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ). Данная угроза двояка:

- 1) к информационным каталогам криобиобанков могут получать неограниченный доступ извне с помощью технологий взлома систем защиты («хакерства»);
- 2) сотрудники криобиобанков могут участвовать в различных схемах распространения идентифицирующей (имена, контактная информация) и сущностной (генетические болезни, предрасположенности родителей, возможности оказания генетической терапии) информации.

В условиях недостаточного регулирования правовой сферы, регламентирующей использование такой информации, к ней могут полулегальным, а иногда и практически легальным образом получать доступ третьи заинтересованные стороны. Главными рисками здесь можно считать следующие:

1. Угроза раскрытия информации о родителях и/или факте использования ВРТ (например, суррогатного материнства) и/или генетических болезнях/предрасположенностях

и злонамеренное использование подобной информации мошенниками, например, с целью шантажа легальных родителей.

2. Перспективы психологического давления и травли, например, в образовательных учреждениях, детей, родившихся с использованием ВРТ, в случае массового раскрытия информации, похищенной или нелегально изъятой из архивов криобиобанков, и помещения ее в открытый доступ в социальные сети, блоги и иные электронные точки доступа в сети интернет.

3. Использование информации о возможностях и перспективах генно-инженерной терапии (возможного вмешательства в геном эмбриона) коммерческими организациями, готовыми оказывать подобные услуги, с целью расширения клиентской базы, освоения новых сегментов рынка и навязывания своих услуг («холодных» звонков).

4. Использование информации о вероятности наследственных заболеваний страховыми компаниями, предоставляющими услуги медицинского страхования или страхования жизни. В настоящее время стратегии медицинского страхования и страхования жизни крайне несовершенны, что признает большинство крупнейших страховых компаний, поскольку для большинства застрахованных портфель страховых услуг недиверсифицирован, т.е. по умолчанию считается, что риски различных заболеваний для большинства людей одинаковы. Диверсификация же страховых рисков позволит получать страховым компаниям сверхприбыли за счет нарушения неотъемлемого права граждан на конфиденциальность информации об их здоровье.

1.4 Заключение

1.4.1 Изучение процессов дифференцировки и дедифференцировки клеток Сертоли мышы

Дифференцировка СПК, составляющих эпителий сети семенника, происходит в постнатальном развитии. Она включает в себя выход из клеточного цикла, снижение экспрессии *Dmrt1* и других генов, характерных для клеток Сертоли. Этот процесс контролируется Т₃ и ФСГ. Но не прямо, а опосредованно: через клетки Сертоли или, что менее вероятно, другие клетки семенника. Причем Т₃ играет решающую роль в дифференцировке СПК: он значительно снижает как их пролиферацию, так и число *Dmrt1*-положительных СПК. ФСГ влияет только на пролиферацию, снижая ее. Эти данные указывают на существование тесных взаимосвязей между дифференцировкой сети семенника и извитых канальцев и на присутствие паракринных сигналов, исходящих от семенных канальцев и воздействующих на сеть семенника.

1.4.2. Криоконсервирование гамет и его правовое регулирование.

В свете все более усиливающихся глобальных тенденций сетевизации, цифровизации и перевода большей части или всей доступной информации о гражданах на электронные носители потенциальный сетевой доступ к архивам криобиобанков создает угрозу сохранения тайны информации при последующем использовании в ВРТ. В связи с чем, необходимо развитие принципов правового регулирования функционирования криобиобанков.

1.5 Список использованных источников

1. Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture//Reproduction. - 2016. - Vol. 152, №4. - P. 271 - 281.
2. 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.
3. Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Formation of the rete testis during mouse embryonic development//Developmental Dynamics. - 2020. - Vol.249, №12. - P. 1486-1499.
4. 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.
5. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Создание модели сокультивирования Сертоли-подобных клеток мыши со сперматогониальными клетками//Клеточные технологии. - 2019. - №2. С. 133 - 138.
6. Raymond C.S., Murphy M.W., O'Sullivan M.G., Bardwell V.J. & Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation// Genes and Development. - 2000. - Vol. 14. P. 2587-2595.
7. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Развитие сети семенника и ее роль в функционировании мужской гонады//Онтогенез. - 2021. - Т.52, №6. - С. 419 - 428. (Kulibin A. Yu., Malolina E. A. The Rete Testis: Development and Role in Testis Function//Russian Journal of Developmental Biology. -2021. -Vol. 52, №6. P. 375 - 383).
8. Guidelines on Male Infertility. <https://uroweb.org/guideline/male-infertility> // European Association of Urology. -2010.
9. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC увеличивает уровень экспрессии Dmrt1 в клетках Сертоли транзиторной зоны семенника мыши в культуре//Гены и клетки. - 2018. - Т. 8. - № 3. - С. 75 - 81.

10. Hernandez A. Thyroid Hormone Role and Economy in the Developing Testis// *Vitam Horm.* - 2018. - Vol. 106. - P. 473 - 500.
11. Migrenne S., Moreau E., Pakarinen P., Dierich A., Merlet J., Habert R., Racine C. Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life// *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7, №12. - P. e53257.
12. Buzzard J.J., Wreford N.G., Morrison J.R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells // *Endocrinology.* - 2003. - Vol. 144, №9. - P. 3722-3731.
13. Sharov K.S. The politics of reproduction: Adoption, abortion, and surrogacy in the age of neoliberalism// *Journal of Family Theory and Review.* - 2021. - Vol. 13. - P. 239-244.

РАЗДЕЛ 2. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

2.1 Введение

Известно, что серотонин проявляет физиологическую активность на самых ранних стадиях индивидуального развития [1] и продолжает играть важную роль плейотропного гормона вне нервной системы у взрослых животных [2]. Большая часть серотонина у позвоночных синтезируется энтерохромаффинными клетками желудочно-кишечного тракта, где он играет роль важного регулятора гладкомышечной моторики и секреторной активности [3]. Здесь же он попадает в кровяное русло и накапливается в тромбоцитах, играя важную роль в процессах вазоконстрикции и свертывания крови [4]. Гуморальное воздействие циркулирующего серотонина на клетки может быть опосредовано активацией мембранных рецепторов, влекущей запуск соответствующих сигнальных каскадов, и/или захватом его внутрь клеток с помощью мембранного транспортера SERT, после чего он может участвовать в посттрансляционной модификации белков посредством серотонилирования [5]. Изменения концентрации циркулирующего серотонина ассоциировано с рядом патологических состояний, как центральной нервной системы, так и периферических органов [4].

Одной из мишеней периферического серотонина является яичник, где он детектируется в физиологически активных концентрациях [6] и имеются все компоненты, необходимые для осуществления его сигнальной функции [7]. Несмотря на наличие экспрессии ферментов синтеза серотонина, основным механизмом, обеспечивающим накопление серотонина в яичнике, является его захват с помощью специфического транспортера SERT, который происходит преимущественно в ооцитах растущих овариальных фолликулов, и практически отсутствует в клетках гранулезы [8]. Наиболее выраженным физиологическим эффектом серотонина на функцию яичника, проявляющимся у разных видов млекопитающих, является активация секреции стероидных гормонов клетками гранулезы, которая опосредуется рецепторными механизмами [9]. Нами ранее показано влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы, которое, ввиду отсутствия активности SERT, скорее всего, опосредовано активацией рецепторов [10]. Однако, системное подавление механизма захвата серотонина путем нокаута гена *Sert* или применения селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), негативно влияет на функциональную активность клеток гранулезы, в том числе угнетает секрецию эстрадиола [11]. По всей вероятности, накопление серотонина в

ооцитах растущих фолликулов опосредованно влияет на функциональную активность клеток гранулезы.

В рамках темы исследовано влияние серотонина на функциональный статус фолликулярных клеток в культуре изолированных овариальных фолликулов и выявлена роль механизма обратного захвата серотонина в этом процессе [12].

2.2 Материал и методы

Первичные многослойные овариальные фолликулы в стерильных условиях выделяли из яичников мышей линии C57BL/6 (Питомник лабораторных животных “Столбовая”) в возрасте 14 дней. Яичники выделяли, разделяли на 8 частей, переносили в среду Лейбовица L15 (Biosera, Франция) с добавлением 50 мкг/мл Liberase DH (Roche, Швейцария) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. В процессе инкубации ткань яичника время от времени разрывали двумя инсулиновыми иглами. Изолированные фолликулы отмывали от ферментов и оценивали под контролем стереомикроскопа по следующим критериям: 1) диаметр 100-130 мкм; 2) поверхность гладкая и не повреждена; 3) один-два слоя клеток гранулезы (возможно наличие нескольких распластанных клеток теки); 4) наличие центрально расположенного округлого ооцита. Овариальные фолликулы, отвечающие этим критериям, случайно переносили в лунки 6-луночного культурального планшета (Corning, США), содержащие 3 мл культуральной среды DMEM/F-12 (Панэко, Россия), с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 3 мМ аланил-глутамин (Панэко, Россия), 0,1 МЕ/мл ФСГ (Merck Serono S.A., Швейцария), 0,1 мкМ андростендиона (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕА/мл пенициллина (Панэко, Россия) и 0,1 мг/мл стрептомицина (Панэко, Россия) и культивировали в течение 6 суток в атмосфере 5% CO₂ при 37°C и ежедневной смене среды. Далее фолликулы, которые прикрепились и активно росли, отмывали от сыворотки и культивировали в среде DMEM/F-12 с добавлением 3 мМ аланил-глутамин, инсулин-трансферрин-селеновой добавки (Панэко, Россия), 0,1 МЕ/мл ФСГ, 0,1 мкМ андростендиона, 100 ЕА/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. В экспериментальных группах к клеткам гранулезы добавляли 1 мкМ серотонина (5НТ); или 1 мкМ серотонина и 10 мкМ флуоксетина (5НТ+FLU). Смену культуральной среды проводили каждые 12 ч. Через 48 ч среду заменяли на DMEM/F-12 с добавлением 1 мг/мл коллагеназы I (Панэко, Россия) и 100 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 30 мин при 37°C и периодическом аккуратном пипетировании. Ооциты из диссоциированных фолликулов собирали стриппером под контролем стереомикроскопа и использовали для исследования экспрессии генов *Vmrb*, *Vmrb15*, *Gdf9* и *Igf1*. Клетки гранулезы пропускали через 40 мкм сито (SPL Lifesciences, Корея)

и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 g, после чего использовали для исследования экспрессии генов *Bad*, *Bax*, *Bcl2*, *Casp3*, *Ccna1*, *Ccnb1*, *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Foxo3*, *Fshr*, *Has2*, *Igfbp4*, *Ihh*, *Lhcgr*, *Mki67*, *Trp53*, *Pcna*, *Ptgfr*, *Ptgs2* и *Star*.

Тотальную РНК из полученных проб выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия), используя 3 мкг гликогена в качестве соосадителя, и обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Библиотеки кДНК синтезировали с помощью набора реактивов Maxima H Minus с применением рандомных гексаолигонуклеотидов (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческой смеси qPCRmix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия). Относительную экспрессию генов (NRQ) рассчитывали методом ddCt с нормировкой на ген *Rps18* и контрольную пробу. Эксперимент проведен в четырех повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США) с применением t-критерия Вилкоксона.

Для оценки жизнеспособности фолликулов в ходе длительного культивирования было проведено окрашивание фолликулов, претерпевших все экспериментальные манипуляции, реагентом ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Red (Thermo Fisher Scientific, США) и последующее выявление живых и мертвых клеток на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV10i (Лаборатория конфокальной микроскопии ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова). Для оценки активности захвата серотонина компонентами овариального фолликула в условиях 2D-культуры была проведена инкубация культивируемых фолликулов с 1 мкМ серотонина в течение 2 ч. Фолликулы фиксировали в 4%-м параформальдегиде (pH 7,5) и окрашивали кроличьими антителами против серотонина (S5545 Sigma-Aldrich, США, разведение 1:1000) и козыми антителами против Ig кролика, конъюгированными с флуорофором CF™568 (SAB4600085 Sigma-Aldrich, США). Специфичность иммуногистохимической реакции оценивали по отсутствию флуоресценции при окрашивании только вторичными антителами. Препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM 880 (Группа оптических методов ЦКП ИБР РАН) и регистрировали иммунофлуоресценцию на срединном оптическом срезе при постоянных параметрах интенсивности лазера и чувствительности детектора. Уровень иммунофлуоресценции на полученных изображениях определяли с помощью программы

ImageJ. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США).

2.3 Результаты и обсуждение

В отчетный период выполнено экспериментальное исследование влияние серотонина на изолированные преантральные овариальные фолликулы, культивируемые на поверхности пластика (2D-культура) в течение 6 сут и 48 ч эксперимента [12]. В ходе культивирования фолликулы прикреплялись к поверхности, расплывались и росли, оставаясь при этом морфологически целостными (рисунок 2.1 В). Проведенное в конце эксперимента выявление живых и мертвых клеток (рисунок 2.1) показало, что в ходе культивирования как клетки гранулезы, так и ооциты остаются живыми (рисунок 2.1 Б, Д, Е).

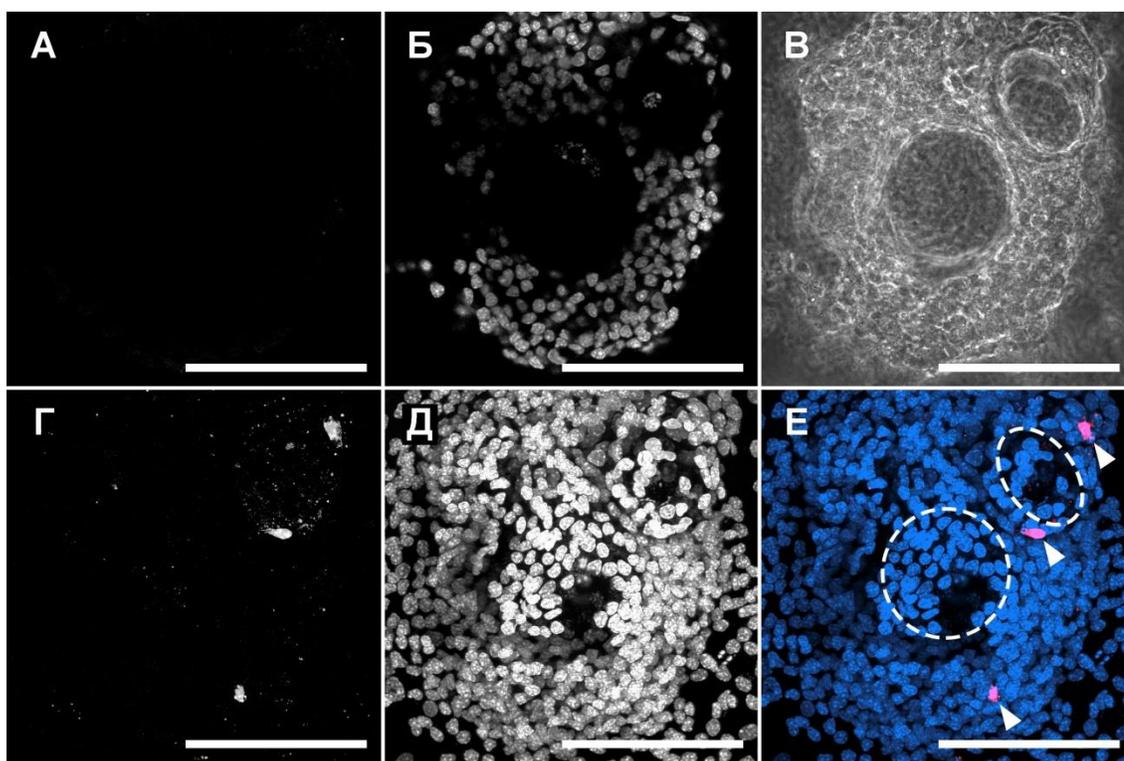


Рисунок 2.1 - Выявление живых и мертвых клеток в овариальных фолликулах после 6 суток предварительного культивирования и 48 ч культивирования в бессывороточной среде (А - Б) срединный конфокальный оптический срез, проходящий через ядра ооцитов; (В) микрофотография в фазовом контрасте; (Г - Е) максимальная проекция стопки конфокальных микрофотографий. (А, Г) мертвые клетки, окрашенные иодидом пропидия; (Б, В) ядра живых клеток, окрашенные красителем Hoechst 33342; (Е) совмещенное изображение мертвых клеток (красный) и ядер живых клеток (синий), пунктиром обозначены границы ооцитов. Масштабный отрезок 100 мкм.

Незначительное количество мертвых фолликулярных клеток выявлялось на поверхности некоторых фолликулов (рисунок 2.1 Г, Е). Иммуногистохимическое исследование активности захвата серотонина в овариальных фолликулах в условиях 2D-культуры показало, что при добавлении серотонина в среду происходит его накопление в ооцитах, тогда как в клетках гранулезы его количество не изменяется (рисунок 2.2). Данные результаты полностью согласуются с данными, полученными ранее на изолированных овариальных фолликулах [13] и фрагментах овариальной ткани [8], что подтверждает адекватность используемой экспериментальной модели. Накопление серотонина подавляется селективным ингибитором обратного захвата серотонина (флуоксетин), но не ингибируется ингибитором неселективного полиспецифического транспорта биогенных аминов (дециний-22). Эти данные говорят о том, что захват серотонина ооцитами осуществляется мембранным транспортером серотонина SERT, но не неселективными транспортерами ОСТ или PMAT [14].

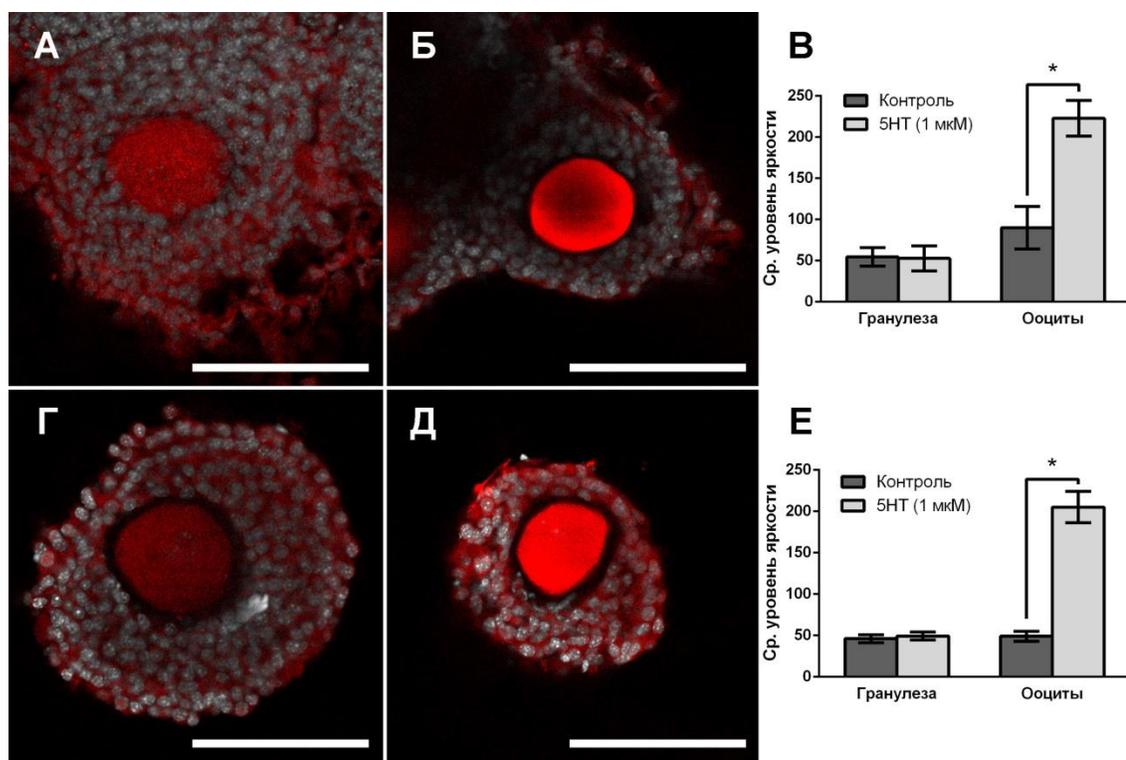


Рисунок 2.2 - Иммуногистохимическое выявление активности захвата серотонина в культуре овариальных фолликулов (А, Б, Г, Д) - совмещенные конфокальные срединные оптические срезы овариальных фолликулов, культивируемых в течение 6 сут (А, Б), и дополнительно культивируемых в бессывороточной среде в течение 48 ч (Г, Д), окрашенных антителами против серотонина (красный) и красителем Hoechst 33342 (белый). (А, Г) контроль; (Б, Д) инкубация с 1 мкМ серотонина в течение 2 ч. Масштабный отрезок 100 мкм. (В, Е) - измерение уровня

иммунофлуоресценции серотонина в клетках гранулы и ооцитах овариальных фолликулов, культивируемых в течение 6 сут (В), и дополнительно культивируемых в бессывороточной среде в течение 48 ч (Е). $M \pm SD$, * - $p < 0.0001$ по t-критерию Стьюдента.

Функциональный статус овариального фолликула в период активного роста выражается, прежде всего, показателями функционального состояния клеток гранулы – важнейшими из которых являются пролиферативная активность, отсутствие апоптоза, стероидогенная активность и маркеры степени дифференцировки [15]. Для оценки этих показателей в работе использовали количественный анализ экспрессии мРНК генов, являющихся маркерами функционального состояния клеток гранулы (рисунок 2.3 А, Б).

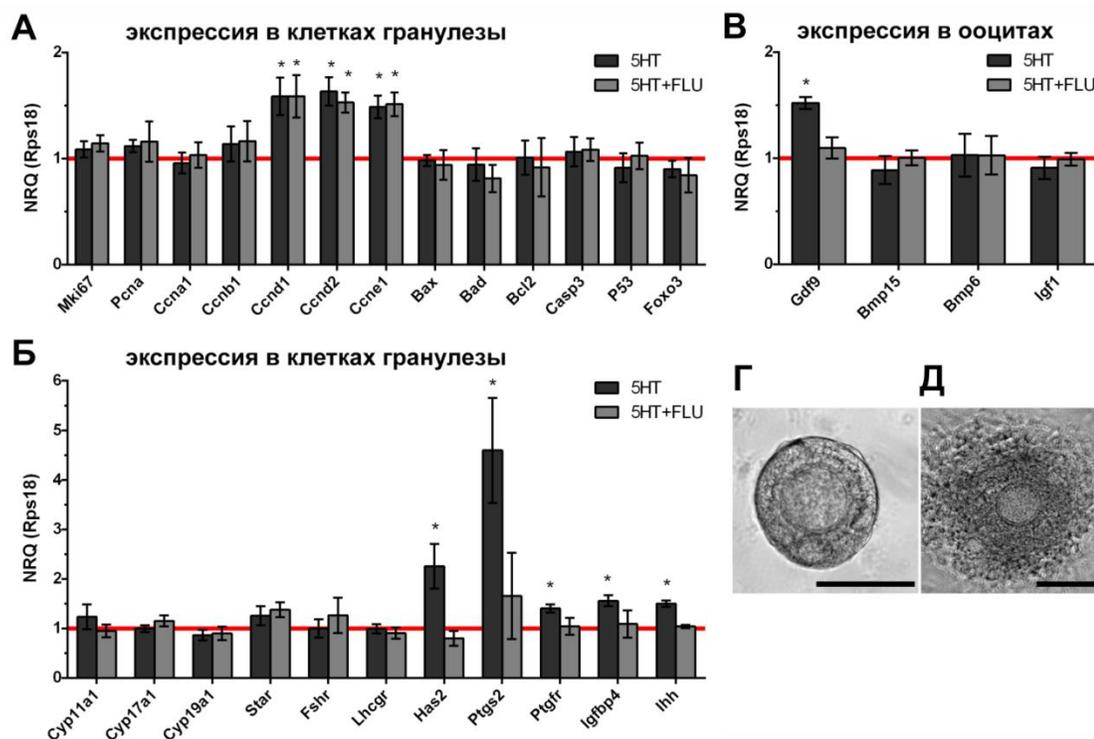


Рисунок 2.3 - Эффект серотонина и флуоксетина на функциональный статус овариальных фолликулов в культуре *in vitro*

(А-В) - Изменение уровня экспрессии в клетках гранулы маркеров их функциональной активности (А, Б) и уровня экспрессии в ооцитах факторов роста (В) в культуре изолированных овариальных фолликулов при добавлении 1 мкМ серотонина (5HT) и 1 мкМ серотонина с 10 мкМ флуоксетина (5HT+FLU). NRQ – нормированная на контрольную пробу относительная экспрессия гена, в качестве референсного гена использовали *Rps18*. Красной линией обозначена экспрессия генов в контрольной пробе, принятая за 1. * - $p < 0.05$ по t-критерию Вилкоксона. Г-Д - первичный многослойный овариальный фолликул сразу после изоляции (Г) и через 6 дней культуры *in vitro* (Д). Масштабный отрезок 100 мкм.

Снижение пролиферативной активности, в сочетании с активацией механизмов клеточной гибели, является маркером атретических процессов [16]. При добавлении

серотонина к культуре изолированных овариальных фолликулов гены-маркеры пролиферации *Mki67* и *Pcna* (а также циклинов *Ccna1* и *Ccnb1*) не изменили уровень экспрессии относительно контроля. Это говорит об отсутствии выраженного митогенного эффекта серотонина на клетки гранулезы. В то же время, количественный анализ выявил достоверное увеличение уровня экспрессии циклина *Ccnd1* в 1,58 раз ($p = 0,0294$), *Ccnd2* в 1,63 раз ($p = 0,0409$) и *Ccne1* в 1,49 раз ($p = 0,044$). Циклины D и E являются ключевыми регуляторными белками, которые способствует переходу клеток к фазе S через фазу G1 [17]. Селективный ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин не отменяет эффект серотонина на экспрессию циклинов, что говорит о том, что в данном эффекте не участвует SERT, и он, скорее всего, опосредован воздействием на рецепторы серотонина. Таким образом, эффект серотонина на пролиферативные свойства клеток гранулезы ограничивается влиянием на уровень экспрессии регуляторов клеточного цикла, но не приводит к увеличению пролиферации. Уровень апоптоза, особенно в условиях культуры, является очень важным показателем функционального статуса овариального фолликула. Серотонин в зависимости от типа активируемого рецептора способен выступать как про- так и антиапоптотическим агентом [18]. В нашем эксперименте не выявлено статистически значимых изменений уровня экспрессии как генов-маркеров апоптоза *Bax*, *Bad*, *Bcl2*, *Casp3*, *Trp53*, так и *Foxo3*, который является инициатором апоптоза в клетках гранулезы, что указывает на отсутствие выраженного про- и антиапоптотического эффекта серотонина.

Важнейшими показателями функциональной активности соматических компонентов овариального фолликула является экспрессия ключевых стероидогенных ферментов, а также гена *Star*, кодирующего эффектор скорость-лимитирующей стадии стероидогенеза [16, 19]. Несмотря на литературные данные о влиянии серотонина на стероидогенную активность, при анализе экспрессии генов *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1* и *Star* достоверных различий между группами не выявлено. По всей видимости, описанные в литературе эффекты связаны с регуляцией активности компонентов системы синтеза стероидных гормонов на посттранскрипционных стадиях. Количественными маркерами степени дифференцировки клеток гранулезы являются гены рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и рецептора лютеинизирующего гормона *Lhcgr* [19], а также гиалуронансинтазы *Has2*, связывающего инсулиноподобный фактор роста белка *Igfbp4*, рецептора простагландина F2-альфа *Ptgfr*, циклооксигеназы *Ptgs2* и лиганда Hedgehog-сигнального пути *Ihh* [16]. При анализе экспрессии генов *Fshr* и *Lhcgr* достоверных различий между группами не выявлено. В то же время, уровень экспрессии гена *Ptgs2* при добавлении серотонина увеличивается в

4,59 раз ($p = 0,0425$), *Has2* – в 2,26 раз ($p = 0,0492$), *Igfbp4* – в 1,56 раз ($p = 0,0373$), *Ihh* – 1,5 раз ($p = 0,0045$), *Ptgfr* – в 1,4 раз ($p = 0,0172$). При этом добавление флуоксетина снижает уровень экспрессии генов до уровня, статистически не отличающегося от контроля, что говорит о наличии вклада захвата серотонина в реализацию этого эффекта. Экспрессия данных генов характерна для зрелых клеток кумулюса, в которых они обеспечивают синтез межклеточного матрикса, необходимого для экспансии кумулюса, и функционирование ключевых механизмов межклеточной сигнализации [20]. Таким образом, серотонин проявляет признаки фактора, способствующего созреванию клеток гранулезы и их дифференцировке в направлении кумулюса.

Одной из целей работы было сопоставление полученных результатов с эффектами серотонина, наблюдаемыми в экспериментах на первичной культуре клеток гранулезы, в отсутствие возможного влияния ооцитов (рисунок 2.4). При прямом воздействии серотонина на клетки гранулезы наблюдался сходный эффект на экспрессию генов-показателей их функциональной активности, однако статистически значимый эффект наблюдался только для

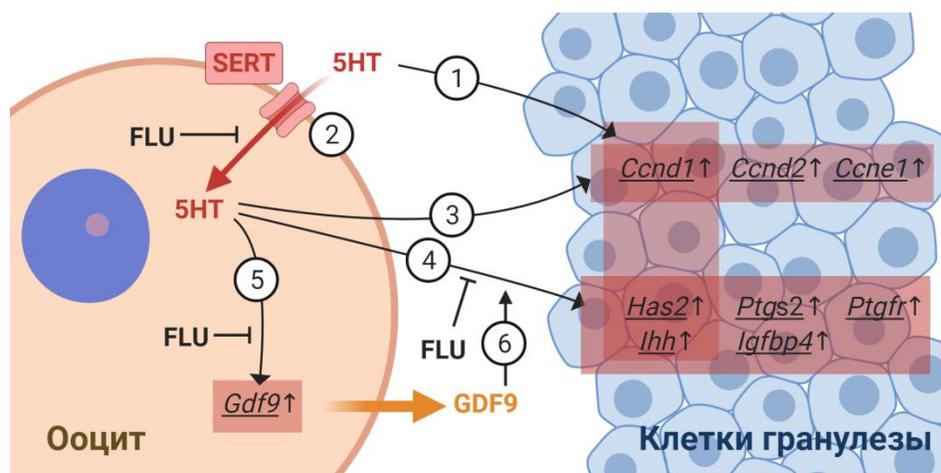


Рисунок 2.4. Схема прямого и опосредованного ооцитом влияния серотонина (5HT) на функциональную активность клеток гранулезы

В культуре клеток гранулезы (1) серотонин стимулирует экспрессию циклина D1 *Ccnd1*, гиалуронансинтазы *Has2* и сигнальной молекулы *Ihh* (по: Никишин и др., 2018). В культуре растущих овариальных фолликулов (2-5) происходит (2) накопление серотонина в ооцитах за счет активности мембранного транспортера SERT, которая ингибируется флуоксетином (FLU). (3) Серотонин стимулирует в клетках гранулезы экспрессию циклинов *Ccnd1*, *Ccnd2* и *Ccne1*, ответственных за переход к синтетической фазе клеточного цикла. Эффект не отменяется флуоксетином. (4) Серотонин стимулирует экспрессию в клетках гранулезы маркеров зрелости *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Ihh* и *Igfbp4*. Эффект отменяется флуоксетином. (5) Серотонин стимулирует экспрессию в ооцитах фактора роста *Gdf9*. Эффект отменяется флуоксетином. (6) GDF9 является регулятором функционального состояния фолликулярных клеток [21].

генов *Ccnd1*, *Has2* и *Ihh* [10]. В культуре изолированных овариальных фолликулов наблюдается более выраженный эффект серотонина, что, по всей вероятности, объясняется большей восприимчивостью клеток гранулезы к воздействию серотонина в этих условиях, более приближенных к нативному состоянию. Известно, что ооциты теснейшим образом связаны с фолликулярными клетками и взаиморегулируют их функциональное состояние [22]. Логично предполагать, что усиление влияния серотонина на функциональную активность клеток гранулезы связано с дополнительным воздействием ооцитов. В пользу этого предположения говорит отмена наблюдаемых эффектов при ингибировании обратного захвата серотонина, который активен в ооцитах, но не в клетках гранулезы. Учитывая, что, помимо мембранного транспортера серотонина, в ооцитах экспрессируется везикулярный транспортер моноаминов [23], есть вероятность, что ооцит экскретирует накопленный серотонин и создает вокруг себя локальную область его повышенной концентрации, усиливая таким образом его воздействие на клетки гранулезы. С другой стороны, серотонин во многих типах клеток играет роль регулятора секреторной активности [5]. Серотонин, накопленный в ооците, вероятно, может влиять на секрецию белковых факторов роста, играющих важную роль в поддержании полноценной жизнедеятельности фолликулярных клеток [22].

Для проверки этого предположения, исследованы эффекты серотонина и флуоксетина на экспрессию в ооцитах ключевых факторов роста, регулирующих функциональный статус фолликулярных клеток (рисунок 2.3 В). В культуре изолированных фолликулов при воздействии серотонина уровень экспрессии *Bmp15*, *Bmp6*, *Igf1* в ооцитах не изменяется, при этом *Gdf9* – увеличивается в 1,52 раз ($p = 0,0116$), причем в присутствии флуоксетина данный эффект снижается, что говорит о вовлеченности механизмов транспорта серотонина в этот эффект. Известно, что GDF9 является одним из ключевых факторов, регулирующих процесс фолликулогенеза на стадии фолликулярного роста и овуляции. Так, например под действием GDF9 в клетках кумулюса возрастает экспрессия генов *Has2* и *Ptgs2* [21]. По всей видимости, захват серотонина ооцитами в растущих овариальных фолликулах, действительно, способствует синтезу и секреции факторов, которые влияют на функциональную активность клеток гранулезы.

Механизм влияния захвата серотонина ооцитом на экспрессию генов и секрецию факторов роста пока остается неясным. Возможность внутриклеточной сигнальной активности серотонина является предметом многолетних дискуссий – именно на ооцитах и ранних эмбрионах были получены фармакологические свидетельства внутриклеточной активности серотониновых рецепторов, которая остается неисследованной [24]. С другой

стороны, внутри клетки серотонин способен принимать участие в регуляции активности белков путем их серотонилирования [25]. Этот механизм задействован в регуляции секреторной активности в тромбоцитах [26] и β -клетках поджелудочной железы [5], может влиять на экспрессию генов путем модификации гистонов [27] и, вполне вероятно, также активен в ооцитах.

2.4 Заключение

Таким образом, в экспериментах на культуре изолированных овариальных фолликулов выявлены эффекты серотонина на экспрессию нескольких генов-показателей функциональной активности клеток гранулы (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Igfbr* и *Ihh*), а также важнейшего ооцитарного фактора роста *Gdf9*. Большая часть наблюдаемых эффектов отменяется флуоксетином, следовательно, опосредована активностью специфического транспортера серотонина SERT (но не неспецифических ОСТ/PMAT-опосредованных механизмов транспорта). Полученный результат является важным свидетельством того, что овариальный серотонин воздействует на функциональную активность клеток гранулы опосредованно через влияние на ооцит, и требует дальнейшего более внимательного исследования.

2.5 Список использованных источников

1. Buznikov G.A. Preneuronal transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem//Russ. J. Dev. Biol. - 2007. - Vol. 38, № 4. P. 213-220.
2. Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without Peripheral Serotonin: Insights from Tryptophan Hydroxylase 1 Knockout Mice Reveal the Existence of Paracrine/Autocrine Serotonergic Networks//ACS Chem. Neurosci. - 2013. - Vol. 4, № 1. P. 64-71.
3. Mawe G.M., Hoffman J.M. Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets//Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. - 2013. - Vol. 10, № 8. P. 473-486.
4. Mercado C.P., Kilic F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels//Mol. Interv. - 2010. - Vol. 10, № 4. P. 231-241.
5. Paulmann N., Grohmann M., Voigt J.-P., et al. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation//PLoS Biol. - 2009. - Vol. 7, № 10. P. e1000229.
6. Bòdis J., Bognàr Z., Hartmann G., et al. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment//Gynecol. Obstet. Invest. - 1992. - Vol. 33, № 3. P. 165-167.

7. Шмуклер Ю.Б., Алешина Н.М., Мальченко Л.А., Никишин Д.А. Серотониновая система в оогенезе млекопитающих//Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. - 2021. - Vol. 71, № 3. - С. 320-334.
8. Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., et al. Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary//Int. J. Mol. Sci. - 2019. - Vol. 20, № 12. P. 3070.
9. Koppan M., Bodis J., Verzar Z., et al. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system//Endocrine. - 2004. - Vol. 24, № 2. P. 155-159.
10. Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л., и др. Влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы в культуре *in vitro*//Фундаментальные аспекты психического здоровья. - 2018. - № 4. P. 12-17.
11. Zha W., Ho H.T.B., Hu T., et al. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance//Sci. Rep. - 2017. - Vol. 7, № 1. P. 1137.
12. Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Алешина Н.М., Мальченко Л.А., Шмуклер Ю.Б. Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулезы//Онтогенез. - 2021. - Vol. 52, № 2. - С. 120-128.
13. Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мыши//ДАН. - 2018. - Vol. 478, № 1. - P. 103-106.
14. Alyoshina N.M., Malchenko L.A., Shmukler Yu.B., Nikishin D.A. Specific serotonin uptake as a functional indicator of the developmental potential of follicles in the mouse ovary//FEBS open bio. - 2021. - Vol. 11, № S1. P. P-03.1-24.
15. Kranc W., Budna J., Kahan R., et al. Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells//J. Biol. Regul. Homeost. Agents. - 2017. - Vol. 31, № 1. P. 1-8.
16. Zhen Y.-H., Wang L., Riaz H., et al. Knockdown of CEBP β by RNAi in porcine granulosa cells resulted in S phase cell cycle arrest and decreased progesterone and estradiol synthesis//J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. - 2014. - Vol. 143. P. 90-98.
17. Bertoli C., Skotheim J.M., Bruin R.A.M.De. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases//Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2015. - Vol. 14, № 8. P. 518-528.

18. Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis//Brain Res. Bull. - 2001. - V. 56, № 5. P. 413-424.
19. Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles//Biol. Reprod. - 1997. - Vol. 56, № 5. P. 1158-1168.
20. Diaz F.J., Wigglesworth K., Eppig J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles//J. Cell Sci. - 2007. - Vol. 120, № 8. P. 1330-1340.
21. Gui L.-M., Joyce I.M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice//Biol. Reprod. - 2005. - Vol. 72, № 1. P. 195-199.
22. Kidder G.M., Vanderhyden B.C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: Ensuring oocyte developmental competence//Can. J. Physiol. Pharmacol. - 2010. - Vol. 88, № 4. P. 399-413.
23. Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., и др. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши//Онтогенез. - 2018. - Vol. 49, № 3. P. 208-216.
24. Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. О внутриклеточной рецепции медиаторов//Нейрохимия. - 2018. - Vol. 35, № 4. P. 289-293.
25. Bader M. Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics//Front. Mol. Neurosci. - 2019. - Vol. 12. P. 288.
26. Walther D.J., Peter J.-U., Winter S., et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release//Cell. - 2003. - Vol. 115, № 7. P. 851-862.
27. Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3//Nature. - 2019. - Vol. 567, № 7749. P. 535-539.

РАЗДЕЛ 3 ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ

3.1 Введение

Вопросы о том, как в ходе эволюции появились и диверсифицировались планы строения животных, и как в связи с этими событиями эволюционировали процессы развития, имеют огромное значение для нашего понимания эволюции царства Metazoa. Ответить на эти вопросы поможет изучение развития и регенерации базальных Metazoa (в том числе типов Porifera и Cnidaria), которые сохранили в развитии эволюционно первичные регуляторные механизмы.

Сигнальные пути cWnt и TGF-beta участвуют в разметке плана строения и формировании осей у всех Metazoa. Они обеспечивают как формирование плана строения у эмбрионов, так и его гомеостаз у взрослых животных. Оба сигнальных каскада также участвуют в регенерации животных разного уровня морфологической сложности - от кишечнополостных до позвоночных. Каскады cWnt и TGF-beta регулируют пролиферацию, миграцию, дифференцировку и апоптоз клеток во время нормального развития и различных регенеративных процессов [1-3]. Изучение роли cWnt и TGF-beta в развитии и регенерации Porifera и Cnidaria позволит выявить эволюционно-консервативную роль этих сигнальных каскадов в регуляции развития животных. В 2021 году мы исследовали регуляторную роль этих сигнальных каскадов на двух моделях - колониальном гидроиде *Dynamena pumila* (тип Cnidaria, класс Hydrozoa) [4] и губке *Halisarca dujardini* (тип Porifera, класс Demospongia) [5]. Исследовался эмбриогенез *D. pumila* и развитие агрегата клеток (полная регенерация тела) у *H. dujardini*. Задачи этого исследования были следующие.

1) Изучить эмбриональное развитие *D. pumila*, и создать таблицу нормального развития; охарактеризовать форму клеток на последовательных стадиях развития в разных регионах эмбриона; реконструировать морфогенезы нормального развития; изучить вовлеченность каскада cWnt в формирование орально-аборальной оси.

2) Изучить последовательные стадии формирования функциональной губки *H. dujardini* из суспензии диссоциированных клеток; идентифицировать компоненты сигнальных путей cWnt и TGF-beta в транскриптоме этого вида; провести филогенетический анализ их последовательностей и сопоставить с ортологами других губок, базальных Metazoa и Bilateria; охарактеризовать экспрессию этих генов на разных стадиях агрегации с помощью RNA-seq и гибридизации in situ.

3) Используя оригинальные и литературные данные, выполнить анализ особенностей и механизмов полной регенерации тела (ПРТ) у губок; классифицировать типы ПРТ; выявить консервативные стадии разных типов ПРТ; выявить основные различия между молекулярными и клеточными механизмами, ПРТ разных таксонов губок [6].

Учитывая, что взрослые стволовые клетки (ВСК) играют важную роль в поддержании стабильного плана строения и регенерационных процессах у губок, было выполнено исследование [7], помогающее решить следующую задачу.

4) На основе анализа собственных и литературных данных выполнить анализ особенностей ВСК у губок (в частности) и у беспозвоночных животных (в целом); выявить основные отличительные особенности ВСК позвоночных и беспозвоночных животных; по результатам анализа предложить модель, обобщающую наши знания о ВСК Metazoa.

Формирование плана строения регулируется не только на молекулярном и клеточном уровнях. Регуляцию морфогенезов, клеточной дифференцировки, активности сигнальных каскадов с помощью механических сил изучает морфомеханика - одна из наиболее интересных и актуальных областей современной биологии развития [8]. В 2021 году мы исследовали роль поля механических напряжений в регуляции гастрюляционных морфогенезов у эмбриона бесхвостой амфибии *Xenopus laevis* [9]. Была поставлена следующая задача.

5) Детально описать движение клеток в эпиктодерме супрабластопоральной области (СБО) средней гастрюлы *X. laevis*; выявить пространственную неоднородность движения клеток СБО; выполнить анализ формы клеток СБО; сопоставить паттерны движения и перегруппировки клеток с картой механических напряжений СБО.

3.2 Материалы и методы

3.2.1. Изучение формирования плана строения в нормальном развитии гидроида

Dynamena pumila на молекулярном и клеточном уровне [4]

Сбор материала и эксперименты проводились на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова (МГУ имени М.В. Ломоносова) (Кандалакшский залив; 66°34' с.ш., 33°08' в.д.) в период полового размножения *Dynamena* (июнь-июль). Половозрелые колонии *D. pumila* были собраны и содержались в натуральной морской водой, при температуре +10-12°C. Для световой и электронной микроскопии образцы фиксировали в течение ночи при +4°C в фиксирующем растворе, содержащем 2,5% глутаральдегида в буферном растворе (0,05 М какодилатном буфере с 15 мг мл⁻¹ NaCl (pH=7,2-7,4) и 0,025% MgCl₂). Затем образцы постфиксировали в 1%-ном тетроксиде осмия в буферном растворе при комнатной

температуре (2 часа для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), 15 мин для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)). Затем их промывали тем же буфером.

Обработку для гистологии, ТЭМ и СЭМ проводили, как описано в [10]. Некоторые эмбрионы были разделены на половинки в 70% этаноле. Окрашенные полутонкие срезы фотографировали под микроскопом Leica DM2500 (Leica, Германия), оснащенный цифровой камерой Leica DFC420C (5.0MP). Контрастированные ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония). Образцы для СЭМ исследовали под микроскопами CamScan-2 (Cambridge Instruments, Великобритания) и JSM-6380LA (JEOL, Япония). Электронную микроскопию проводили в лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Для конфокальной микроскопии эмбрионы фиксировали в 4% параформальдегиде в FSW в течение ночи при +4°C. Фиксированные образцы промывали 3x15 мин 1% PBST (1% Triton-X100 в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS)), затем обрабатывали 1% PBST в течение 2 часов. Для иммуноцитохимической визуализации митотических веретен образцы обрабатывали блокирующим раствором (6% бычьего сывороточного альбумина в PBS) в течение 2 часов при комнатной температуре и инкубировали в первичных антителах против ацетилированного α -тубулина (мышинные моноклональные, 1 мг/мл, Sigma Cat#T7451, США), разведенных в блокирующем растворе (2 мкг/мл) в течение ночи при +4°C. После инкубации с первичными антителами образцы промывали 3x15 в 1% PBST и обрабатывали блокирующим раствором в течение 2х часов. Затем образцы инкубировали с 1,5 мкл/мл антител Goat Anti-Mouse IgG, меченных DyLight 488 (1,5 мг/мл; Jackson ImmunoResearch Cat #115-486-003, США) в блокирующем растворе в течение ночи при +4°C. Затем образцы промывали 3x10 мин в PBS. Окрашивание конъюгированным с BODIPY фаллацидином и DAPI проводили, как описано в [11]. Оптическое просветление тканей достигалась путем обработки эмбрионов раствором Murray's Clear (2:1 смесь бензилбензоата и бензилового спирта) [12]. Серии оптических срезов получали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1 (Токио, Япония).

Для визуализации клеточной пролиферации эмбрионы и планулы инкубировали в FSW с 20 мкМ EdU в течение 2 ч при температуре 14-16°C. Затем образцы промывали 3-кратно фильтрованной морской водой и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи. Затем образцы промывали 3-кратно FSW и фиксировали в 4% параформальдегиде в PBS в течение ночи при 4°C. Дальнейшая обработка проводилась в соответствии с протоколом производителя (Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 647 Imaging Kit, #C10340, Thermo

Fisher Scientific). Образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1 (Токио, Япония).

Эмбрионы на стадии дробления/ранней гаструлы обрабатывали 2,5 мкМ 1-азакенпаулона (Sigma, Канада/Китай) или 10 мкМ iCRT-14 (Sigma, США/Китай) для активации/ингибирования cWnt сигналинга. Контрольные эмбрионы подвергались воздействию 0,1% ДМСО в FSW. Инкубацию проводили в темноте.

Эмбриональную библиотеку кДНК готовили из тотальной РНК с помощью набора для синтеза кДНК Mint ("Евроген", Россия), используя подход SMART. Фрагменты кДНК генов *D. pumila* для гибридизации *in situ* выделяли из эмбриональной библиотеки кДНК методом ПЦР. Специфические праймеры были разработаны на основе последовательностей из секвенированного транскрипта *D. pumila* [13]. Протокол гибридизации *in situ* был адаптирован из [14]. Эмбрионы фиксировали 4% параформальдегидом в FSW в течение ночи при +4С, промывали PBS и хранили при -20С в 100% метаноле до гибридизации. Образцы регидратировали с помощью PTw (1x PBS с 0,1% Tween 20) и обрабатывали протеиназой К (80 мкг/мл, 22°С) в течение 4 минут. Гибридизацию с мечеными дигоксигенином антисмысловыми РНК-зондами (1 нг/мкл) проводили при 58°С. Перед гибридизацией образцы нагревали при +80°С в течение 30 минут для инактивации эндогенной щелочной фосфатазы, чтобы избежать ложноположительного результата реакции. Для детекции зонда использовали антитела Anti-DIG AP (Roche; разведение 1/2000) и субстрат NBT/BCIP (Roche). После цветной реакции образцы промывали метанолом для уменьшения фонового окрашивания и монтировали в глицерин (87%). Изображения получали с помощью микроскопа Leica M165C (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC420C (5.0MP).

3.2.1. Изучение полной регенерации тела (ПРТ) губок на молекулярном и клеточном уровне [5, 6]

Губки *Halisarca dujardini* Johnston, 1842 были собраны в Кандалакшском заливе Белого моря в окрестностях Беломорской биологической станции им. Перцова и в заливе Чупа у острова Средний из верхней сублиторальной зоны на глубине 0-5 м. Перед началом экспериментов все губки выдерживались в лабораторном аквариуме при естественных для моря температурах не более + 10°С. До начала экспериментов все губки содержались в лабораторном аквариуме с природной морской водой при температуре + 6-10С не более 24 ч.

Ткани губок диссоциировали путем продавливания через 50-мкм нейлоновую сетку в сосуды с фильтрованной стерильной морской водой (FSW). FSW использовали также для

последующего культивирования клеток. Воду стерилизовали с помощью шприцевых фильтров 0,22 мкм (Sartorius). Полученную суспензию клеток разбавляли FSW до концентрации $1-3 \times 10^7$ клеток/мл и выдерживали в FSW при температуре +8-12 С. Половину культуральной среды заменяли свежей FSW каждые 2 дня. Каждую культуру клеток проверяли и фотографировали ежедневно в течение всего периода культивирования с помощью стереомикроскопа Leica M165FC (Leica), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 420 и приложением Leica LAS Store and Recall v.4.2. Для гистологических исследований агрегаты фиксировали 2,5% глутаральдегидом и 1% OsO₄ в модифицированном 0,1 М Na-какодилатном буфере (0,1 М Na-какодилат, 85,55 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂; pH 7,0-7,5) и заливали в эпоксидную смолу Epon/Araldite. В соответствии с морфологией *in vivo* и гистологической структурой агрегатов выделяли шесть стадий реагрегации: первичные многоклеточные агрегаты, примморфы ранней стадии, истинные примморфы, развивающиеся примморфы, прогрессирующие развивающиеся примморфы и реконструированные функциональные губки.

Мы использовали транскриптом *H. dujardinii*, который был ранее секвенирован с помощью Illumina HiSeq 2500 и собран в виде контигов [15]. РНК для сборки референсного транскриптома была выделена из взрослых губок и личинок.

Поиск компонентов сигнальных путей проводился с помощью метода BLAST. Ортологи генов губок, книдарий и билатерий использовались в сборке транскриптома *H. dujardinii*. Предполагаемые положительные совпадения затем искали на наличие консервативных доменов с помощью HMMER 3.3.2 по базе данных Pfam и выравнивали с ортологами других организмов. Выравнивание проводилось с помощью MUSCLE и затем корректировалось вручную. Для байесовского анализа мы применяли MrBayes 3.2.7, используя смешанную модель с четырьмя независимыми прогонами по два миллиона прочтений. Для анализа максимального правдоподобия мы использовали RAxML 8.0 с выбором модели с помощью ProtTest3. Консенсусные деревья были визуализированы в FigTree 1.4.4. Идентифицированные последовательности *H. dujardinii* были загружены в GenBank с номерами доступа MZ042492-MZ042530.

Для анализа RNA-seq, РНК выделяли из агрегатов на последовательных стадиях регенерации, 1 день после диссоциации (dpd) и 6 dpd. Агрегаты промывали несколько раз FSW и обрабатывали набором RNAeasy (QIAGEN). Библиотеки кДНК создавали и секвенировали с помощью Illumina HiSeq 4000 в Genomics Core of Research Technology Support Facility (Мичиганский государственный университет). Выход парных 150 bp

прочтений составил 109 млн. для образцов 1-dpd и 108 млн. для образцов 6-dpd. Чтения были псевдовыровнены с помощью Kallisto 0.42.4 по референсному транскриптому, а анализ дифференциальной экспрессии был выполнен в программе edgeR 3.12 в R.

Для гибридизации *in situ* агрегаты фиксировали в MOPS. Агрегаты на одной и той же стадии развития собирали вручную из культуры. Фиксированные агрегаты хранили при -20°C в 70% EtOH. Из-за хрупкости материала регидратацию из 70% EtOH в буфер PTw проводили по каплям в течение 30-90 мин. Ткани обрабатывали протеиназой K (5 мкг/мл) в течение 10 мин при +37°C. Фрагменты лигандов TGF-beta амплифицировали из кДНК и клонировали в вектор pAL-2T (Evrogen). Вставки были проверены секвенированием по Сэнгеру и использованы для синтеза зондов. Антисмысловой РНК-зонд, меченный дигоксигенином, был изготовлен с помощью транскрипции *in vitro* с использованием смеси для маркировки РНК DIG (Roche) и соответствующей РНК-полимеразы (ThermoScientific). Некоторые образцы после гибридизации обезживали в этаноле и заключали в гликольметакрилат в соответствии. Срезы толщиной 5-7 мкм изготавливали стеклянным ножом на ультрамикротоме Leica UC7.

3.2.3 Изучение морфомеханики эмбриональных тканей [9]

Икру *X. laevis* получали согласно стандартному протоколу, оплодотворяли *in vitro* и культивировали в 0,1 Marc's Modified Ringer (MMR) при комнатной температуре. Стадию развития эмбрионов определяли по таблицам нормального развития [16].

Для визуализации клеточных границ осуществляли инъекцию мРНК мембранного (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркёров. мРНК синтезировали с плазмид pCS2+/GAP43-GFP и pCS2+/H2B-mCherry. Выделение целевых плазмид после амплификации осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Evrogen), синтез РНК – с помощью набора mMESSAGING mMACHINE™ SP6 Transcription (Invitrogen), согласно предоставленному производителем протоколу.

Зародышей на стадиях от 2-х до 4-х бластомеров переносили из 0,1 MMR (Marc's Modified Ringer) в раствор фикола на 0,3 MMR. Затем осуществляли инъекцию мембранного (РНК GAP43-GFP) и ядерного (РНК H2B-mCherry) маркёров общим количеством 230 пг в случае GAP43-GFP и 230 пг в случае H2B- mCherry. Инъекцию производили в каждый из анимальных бластомеров, суммарный объём инъекции составлял 4,6 или 9,2 нл.

На стадии 10,5 зародышей переносили в 1x MMR, снимали желточные оболочки и оставляли на 5 минут для компенсации стресса. По прошествии 5 минут зародышей вносили в 35 мм чашки Петри с дном из покровного стекла, заполненные 1% агарозой с низкой

температурой плавления на 1x MMR. Зародышей ориентировали внутри сделанных в агарозе лунок так, чтобы медиальный участок СБО каждого эмбриона оказался вблизи покровного стекла. После этого осуществляли цейтраферную микрофотосъемку на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV-10i и. В ходе съёмки регистрировали единичный оптический срез вблизи апикальной поверхности клеток эпизодермы. Под формой клетки мы будем понимать форму сечения клетки, зарегистрированного на таком оптическом срезе. Съёмку производили в течение часа с частотой 1 кадр/мин, время съёмки единичного кадра – 8 сек.

Распознавание клеточных границ на кадрах осуществляли с помощью программы EriTools 2.1.6. При необходимости, перед морфометрическим анализом результаты распознавания клеточных границ корректировали вручную с помощью плагина CellEditor в составе EriTools 2.1.6. Данные морфометрического анализа экспортировали с помощью плагина CellOverlay, и затем осуществляли статистическую обработку данных в программах ICY, Microsoft Excel 365, RStudio 1.4.1106 и STATISTICA 10.0.

Смещения клеток оценивали с помощью модуля CELL_OUTLINE в составе ПО EriTools 2.1.6. С помощью данного модуля на каждом из кадров цейтраферной съёмки вычисляли координаты геометрического центра каждой из клеток на оптическом срезе и экспортировали полученные значения в Microsoft Excel 365. Затем для каждой клетки в Microsoft Excel 365 рассчитывали величину смещения и угол между направлением смещения клетки и передне-задней осью эмбриона за время между двумя кадрами:

1) Смещение рассчитывали, как кратчайшее расстояние между геометрическим центром клетки на двух последовательных кадрах. Для этого вычисляли отдельно разность координат X (ΔX) и разность координат Y (ΔY) центра масс клетки между двумя последовательными кадрами, после чего находили смещение D как корень из суммы квадратов ΔX и ΔY (т.к. смещение D и его компоненты ΔX и ΔY образуют прямоугольный треугольник, где D – гипотенуза, а ΔX и ΔY – катеты). Так временной промежуток между кадрами составляет 1 мин, рассчитанное перемещение D , фактически, представляет собой среднюю скорость смещения клетки с размерностью мкм/мин.

2) Для вычисления угла α (принимает значения от 0° до 360°) между вектором смещения клеток и передне-задней осью сначала находили тангенс угла смещения $\text{tg}(\alpha) = \Delta X / \Delta Y$, после чего с помощью функции арктангенс (ATAN) находили величину угла смещения в градусах.

3) Сонаправленность смещений клеток оценивали с помощью параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$, где α – угол между направлением смещения отдельной клетки и передне-задней осью эмбриона, а скобки $\langle \rangle$ - усреднение по нескольким значениям. Если траектория смещения и ось эмбриона параллельны и сонаправлены, угол между ними равен 0° , и S принимает значение равное $\cos(0^\circ) = 1$, если же они параллельны, но имеют противоположные направления, угол между ними равен 180° , а S принимает значение равное $\cos(180^\circ) = -1$.

4) Форму клеток оценивали через эксцентриситет — числовую характеристику конического сечения, показывающую степень его отклонения от окружности. Эксцентриситет отражает изменение соотношения длины большой и малой осей клетки. Его рассчитывали как $E = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$, где a – длина большой оси, b – длина малой оси. Длину большой и малой оси для каждой клетки на кадре вычисляли с помощью модуля ELLIPSE_FIT.

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1. Изучение формирования плана строения в нормальном развитии гидроида *Dynamena pumila* на молекулярном и клеточном уровне [4]

Мы проследили эмбриональное развитие *D. pumila* от первого деления дробления до формирования личинки планулы (рисунок 3.1 А). На всех стадиях показана высокая индивидуальная изменчивость структуры эмбрионов, выявлены обуславливающие её особенности процессов развития. Так, на стадии дробления, активные перемещения blastomeres, высокая вариабельность скорости цитотомии и ориентации митотических веретен приводит к большому разнообразию структуры эмбрионов на стадии 8-64 клеток. Эмбрион проходит стадию морулы, когда митотические веретена ориентированы перпендикулярно поверхности эмбриона и дочерние клетки попадают внутрь (рисунок 3.1 А, Б). Бластула формируется, когда все митотические веретена направлены параллельно поверхности эмбриона (рисунок 3.1 А). Тем не менее, эмбрионы бластульного типа к 64-клеточной стадии всегда превращаются в эмбрионы морульного типа благодаря переупаковке клеток и/или ориентации митотических веретен (рисунок 3.1 А).

Мы показали, что у *D. pumila* гастрюляция начинается как первичная (клеточная) деляминация. Клетки, которые попадают внутрь эмбриона во время формирования морулы, становятся частью эндодермы, как, например, у *Hydractinia echinata* [17]. Таким образом,

гастрюляция у этого вида начинается очень рано - при образовании морулы во время раннего дробления, или во время перехода от бластулы к моруле на стадии 16-64 клеток (рисунок 3.1 А). Вторая фаза гастрюляции - морульная (вторичная) деламинация начинается с образования множественных фрагментов эпителиального листа на изгибах поверхности эмбриона (рисунок 3.1 А, В, Г). На этой стадии эмбрионы имеют неправильную форму, и их морфология сильно варьирует (рисунок 3.1 Г). По нашему мнению, макроскопические деформации эмбриона, обусловленные условиями развития, являются на этой стадии основным источником морфологической изменчивости. На микроскопическом уровне основным источником изменчивости является морфогенез локальных фрагментов эпителиального листа. Он протекает за счет последовательного кооперативного изменения формы клеток и ориентации их апико-базальных осей (рисунок 3.1 В). Поэтому невозможно предсказать количество, размер и расположение фрагментов эпителиального листа у эмбриона на стадии ранней гастрюлы. На следующем этапе гастрюляции фрагменты эпителиального пласта объединяются в тороидальные поверхности (рисунок 3.1 А, Д). Морфологическая изменчивость при этом снижается.

В ходе дальнейшего развития отверстия тороидальных поверхностей постепенно замыкаются, и морфологическая изменчивость продолжает уменьшаться. К концу гастрюляции формируются зародыши двух морфологических типов (рисунок 3.1 А). В первом случае полностью эпителизованная эктодерма окружает массу неэпителизованных эндодермальных клеток. Такой эмбрион можно рассматривать как паренхимулу (рисунок 3.1А). Гастрюляция может также привести к формированию эмбриона с полостью, которая связана с внешней средой через "канал" последней тороидальной поверхности (рисунок 3.1 А, Е). Базальные поверхности эктодермальных и эндодермальных клеток выравниваются, и формируется тонкая базальная мембрана, разделяющая зародышевые листки. В этот момент гастрюляция завершается и формируется личинка планула (рисунок 3.1 А, Ж).

Электронная микроскопия показала, что объединение фрагментов эпителиального пласта у эмбриона *D. pumila* происходит за счет "филоподиального прайминга". Этот же клеточный механизм обеспечивает заживление ран в эмбриональных тканях и формировании непрерывного эпителия в эмбриогенезе высших Metazoa [18]. Клетки, расположенные на краях двух фрагментов пласта, "находят" друг друга и соединяются за счет тонких филоподий, которые формируют точечные адгезионные контакты с телом клетки. Затем филоподии интердигитируют, а адгезионные контакты увеличиваются в длину. Таким

образом, этот морфогенетический механизм высоко консервативен и, скорее всего, эволюционно первичен для Metazoa.

У *D. pumila* морфологическая полярность (анимальный полюс) зиготы определяется по расположению ядра и месту образования борозды первого деления дробления (рисунок 3.1 А). Анимальный полюс соответствует проспективному оральному полюсу личинки [19]. Однако, начиная со второго деления дробления, ось эмбриона не может быть идентифицирована по морфологическим признакам, и обнаруживается только, начиная со стадии поздней гастролы/препланулы, когда начинается морфологическая дифференцировка орально-аборальной оси личинки (рисунок 3.1 А).

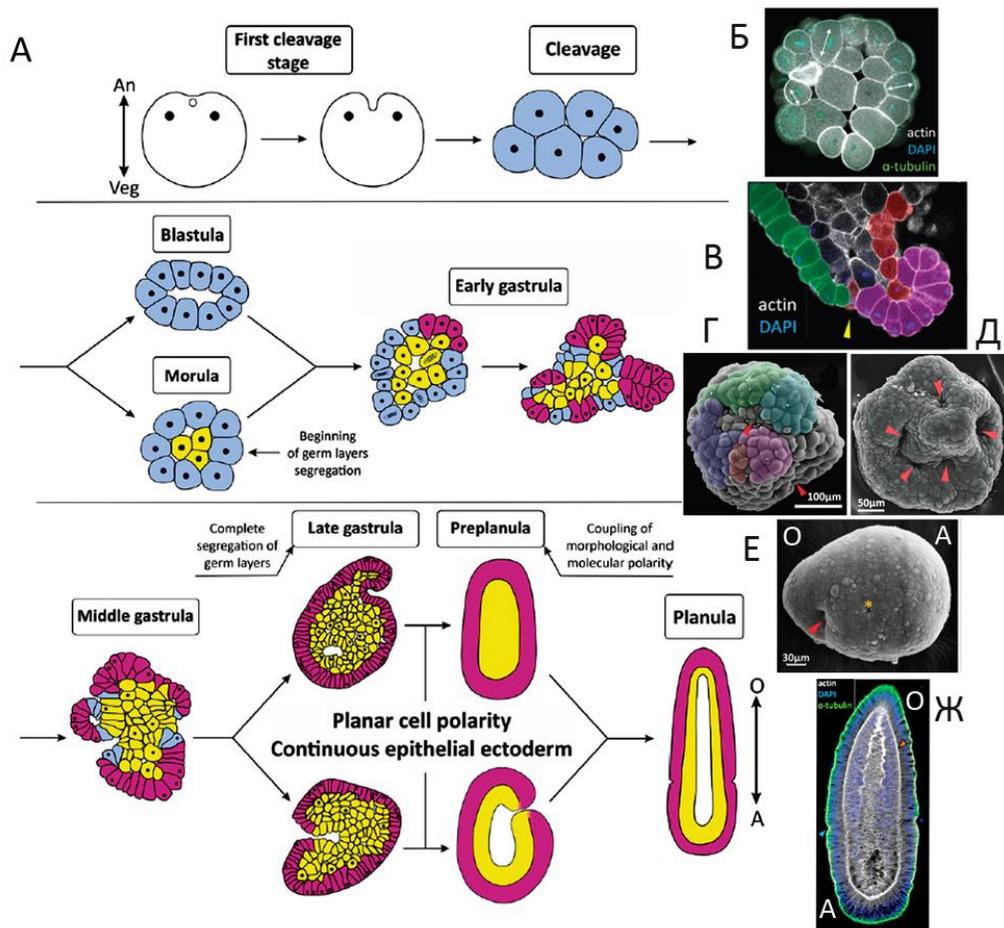


Рисунок 3.1 - Нормальное развитие *D. pumila*

А - схема нормального развития. Б - стадия морулы, стрелки - ориентация митотических веретен. В - формирование локального фрагмента эпителия (показан розовым цветом), стрелка указывает на границу фрагмента. Г - ранняя гастрולה, фрагменты пласта выделены цветом, красные стрелки - отверстия тороидальных поверхностей. Д - средняя гастрולה, эмбрион состоит из нескольких тороидальных поверхностей. Е - начало дифференцировки орально-аборальной оси, остается одно отверстие тороидальной поверхности, О - оральный полюс, А - аборальный. Ж - стадия планулы. Б, В, Ж – CLSM; Г, Д, Е - СЭМ.

Планарная интеркаляция клеток является ключевым механизмом конвергентного удлинения передне-задней оси тела высших Metazoa [20]. Во время планарной интеркаляции клетки перемещаются в плоскости эпителия, обмениваются соседями [20]. Этот процесс можно выявить, анализируя динамику конфигурации клеточной сети [21]. У средней гастролы *D. pumila* в некоторых областях поверхности эмбриона обнаруживаются тетра- и пентагональные апексы клеток, пересечения которых образуют четырехсторонние вершины. Такая (отличающаяся от стабильной гексагональной) упаковка клеток говорит о продолжающейся планарной интеркаляции. Мы предполагаем, что на этой стадии планарная полярность клеток является локальной, и морфогенетические движения клеток происходят независимо в разных областях эмбриона.

У поздней гастролы *D. pumila* последнее незамкнутое отверстие тороидальной поверхности является хорошим маркером морфологической полярности (рисунок 3.1 Е). Морфологическая дифференциация первичной оси тела происходит во время перехода от гастролы к преплануле. Мы предполагаем, что каждая тороидальная поверхность организует локальное поле механических напряжений, которое ориентирует планарную интеркаляцию у эмбриона. Экспериментально показано, что последний неэпителизированный участок эмбриональной поверхности, т.е. последнее незамкнутое отверстие тора, располагается в оральной половине формирующейся препланулы [22]. Поле механических напряжений, генерируемых последней тороидальной поверхностью, может координировать глобальную планарную интеркаляцию во время формирования морфологической оси у *D. pumila*.

Распределение пролиферирующих клеток также становится асимметричным на стадии препланулы (рисунок 3.2 А). Начиная с этой стадии, были обнаружены две области клеточной пролиферации. В эндодерме на стадии поздней планулы область пролиферации соответствует области экспрессии *DpVasal*, *DpPiwi1* и *DpNanos1* (рисунок 3.2 Б). Это означает, что эндодерма личинок является областью пролиферации стволовых клеток (i-клеток). В эктодерме личинки пролиферирующие клетки не экспрессируют гены-маркеры i-клеток (рисунок 3.2 Б). Эктодермальная область пролиферации расположена на оральном конце личинки (рисунок 3.2 А). Пролiferация эктодермальных клеток, способствует удлинению оси тела вместе с планарной интеркаляцией клеток. Пролiferация почти прекращается в оральной эктодерме личинки, когда она достигает своей полной длины (рисунок 2 А).

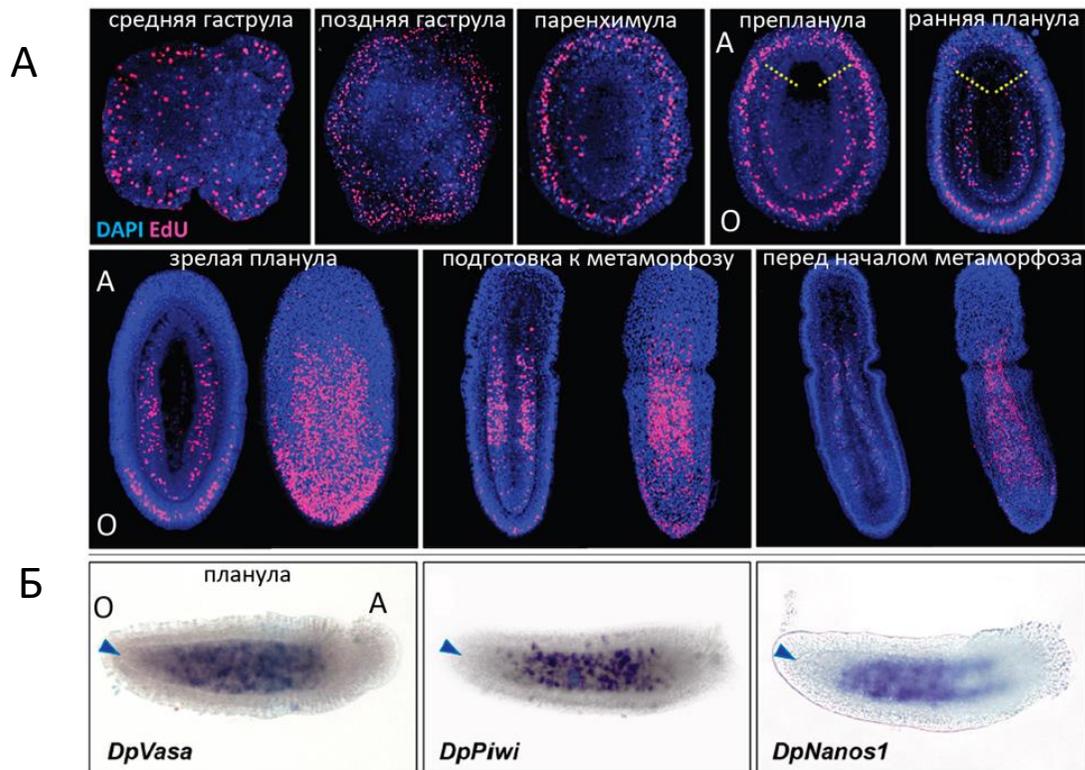


Рисунок 3.2 - Распределение пролиферирующих клеток у эмбриона и личинки *D. pumila* (А), а также экспрессия генов-маркеров стволовых клеток у личинки (Б)
 О - оральный, А - аборальный полюса личинки; голубая стрелка - оральная энтодерма.

У видов кишечнополостных с поляризованной гастрюляцией область активности *cWnt* определяет личиночный оральный домен и совпадает с областью гастрюляционного морфогенеза и спецификации энтодермы [23, 24]. У средней гастрюлы *D. pumila* гибридизация *in situ* выявила широкие области экспрессии компонентов *cWnt*, так что будущая оральная область эмбриона уже специфицирована (рисунок 3.3 А). Однако морфология эмбриона и морфогенетические движения не колокализованы с молекулярным паттернингом. Более того, во время гастрюляции *D. pumila* не существует единой области экспрессии генов энтодермальных маркеров (рисунок 3.3 Б). Мы предполагаем, что у *D. pumila* спецификация клеток энтодермы не связана с областью активности *cWnt*. Таким образом, формирование зародышевых листков и морфогенетические процессы не колокализируются и могут быть не связаны с молекулярной разметкой первичной оси во время гастрюляции.

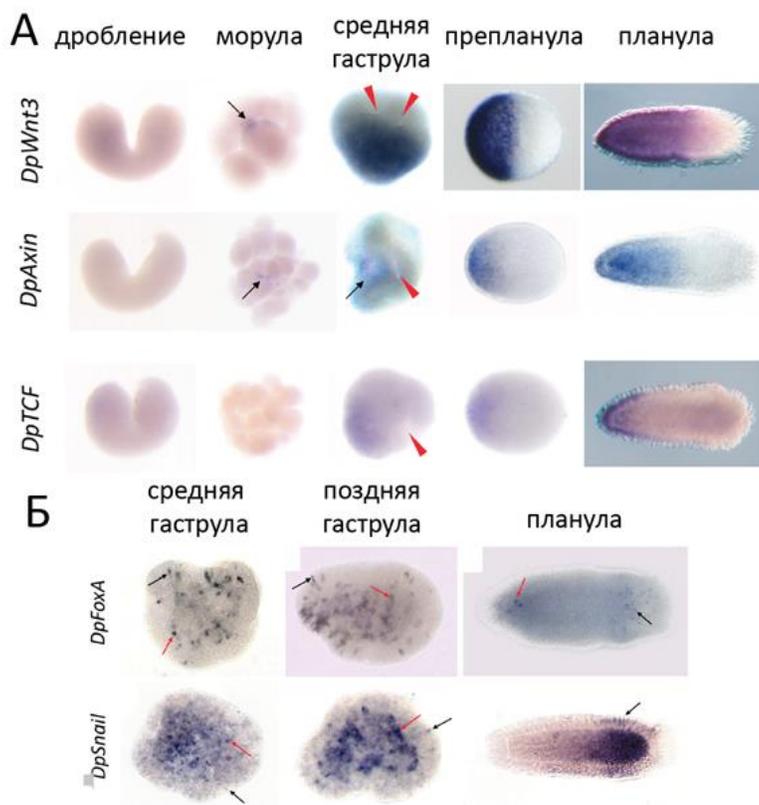


Рисунок 3.3 - Экспрессия генов компонентов sWnt каскада (А) и маркеров эндодермы (Б) на последовательных стадиях развития *D. pumila*. Оральный полюс планул слева. Красные стрелки на А - отверстия тороидальных поверхностей, черные стрелки - паттерны экспрессии. На Б - черные стрелки - экспрессия в эктодерме, красные - экспрессия в эндодерме.

Начиная со стадии препланулы, характер экспрессии компонентов sWnt соответствует морфологии эмбриона *D. pumila*. Экспрессия была обнаружена в оральной области препланулы - области с наиболее высокой подвижностью клеток (рисунок 3.3 А). Экспериментально было показано, что оральный домен *D. pumila* обеспечивает удлинение планулы, в то время как аборальный домен морфогенетически пассивен [22]. Таким образом, sWnt может выступать в качестве регулятора морфогенеза во время морфологической дифференциации оси личинки. Также показано, что у *D. pumila* повышение активности сигнала sWnt приводит к формированию личинки с очень широким оральным доменом (рисунок 3.4).

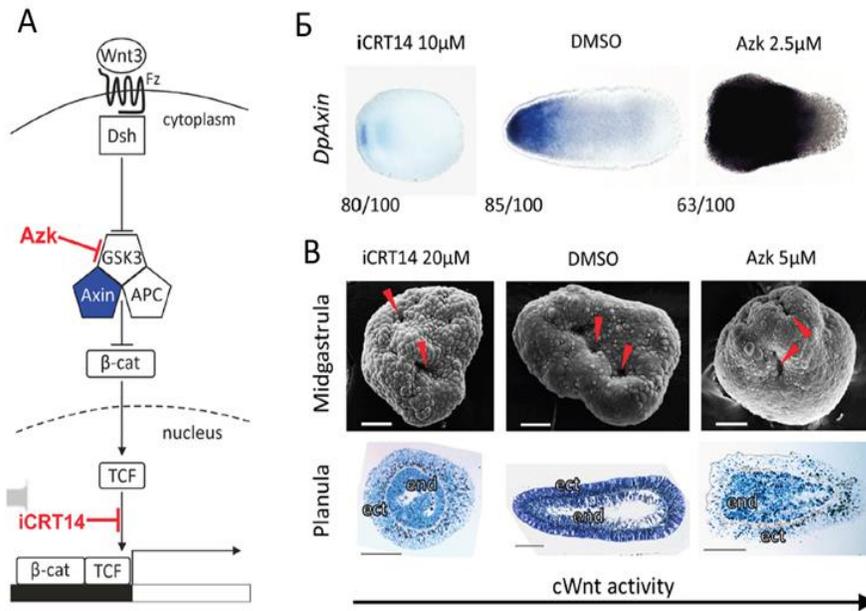


Рисунок 3.4 - Последствия фармакологических экспериментов по изменению активности cWnt каскада для личинок *D. pumila*

А - схема фармакологических интервенций в cWnt каскад. Б - экспрессия компонентов cWnt каскада у планул в экспериментах. В - морфология эмбрионов (СЭМ) и строение планул (полутонкие срезы) в экспериментах.

Ось тела остается единой, несмотря на модуляцию активности cWnt. У другого гидроида, *Hydractinia echinata*, гиперактивация cWnt каскада вызывает формирование мультиполярной личинки с несколькими оральными полюсами [25]. Таким образом, устойчивость морфологической оси тела к изменениям в cWnt может быть разной у разных видов кишечнополостных. Морфологическая ось в развитии *D. pumila* формируется поздно, но она очень устойчива по отношению к внешним воздействиям.

3.3.2 Изучение полной регенерации тела губок на молекулярном и клеточном уровне [5, 6]

Репаративная регенерация может происходить как восстановление поврежденных клеток, тканей и органов или как реконструкция организма из его небольшого фрагмента, т.е. полная регенерация тела (ПРТ). ПРТ описана, в основном для базальных животных: Porifera, Placozoa, Stenophora и Cnidaria. Однако ПРТ также известны у Acoela, плоских червей, нематод, аннелид, иглокожих, полухордовых и колониальных асцидий. ПРТ может происходить либо с сохранением полярности и симметрии исходного организма, либо путем

полной перестройки тканей и формирования оси тела *de novo*. Последний тип ПРТ был назван соматическим эмбриогенезом.

Оси тела губок явно отличаются от осей других многоклеточных животных, поскольку у большинства губок есть ось полярности, но нет оси симметрии [3]. У губок *Amphimedon queenslandica* и *Sycon ciliatum* каскады Wnt и TGF-beta участвуют в формировании осей тела эмбриона и взрослого организма. Кроме того, у взрослого *S. ciliatum* экспрессия некоторых компонентов Wnt и TGF-beta ограничена оскулюмом и входными отверстиями в хоаноцитные камеры, т.е. осевыми структурами [26]. Участие Wnt и TGF-beta в регенерации после повреждения у губок не изучалось. Наиболее удобной моделью для изучения формирования полярности в ходе регенерации служит ПРТ после диссоциации тканей и реагрегации клеток.

Детальные исследования *in vivo*, дополненные гистологическими и ультраструктурными исследованиями, позволяют нам определить несколько ключевых стадий реагрегации клеток *H. dujardinii*, процесса, ведущего от суспензии клеток к полностью функциональной губке (рисунок 3.5):

(1) Первичные многоклеточные агрегаты (ПМА) (рисунок 3.5 А), 0-24 ч после диссоциации (hpd). Первые небольшие ПМА появляются в культуре после 20-30 мин культивирования в результате случайных контактов между отдельными клетками. В течение последующих 24 ч они растут, присоединяя к себе новые клетки или сливаясь друг с другом. Отличительные особенности ПМА - неправильная форма и отсутствие каких-либо признаков внутренней структуры.

(2) Ранние примморфы (РПМ) и истинные примордии (ИПМ) (рисунок 3.5 Б), 1-3 дня после диссоциации (dpd). Начиная с 1 dpd, ПМА начинают превращаться в РПМ и ИПМ. Поверхность агрегата постепенно покрывается экзопинакодермой, что приводит к изоляции внутренней среды агрегата. РПМ частично покрыты экзопинакодермой, а ИПМ характеризуются непрерывной экзопинакодермой. Поскольку скорость формирования экзопинакодермы у разных агрегатов различна, культура через 1 dpd представляет собой смесь РПМ и ИПМ. Через 3 dpd эпителизация завершается, и культура содержит ИПМ.

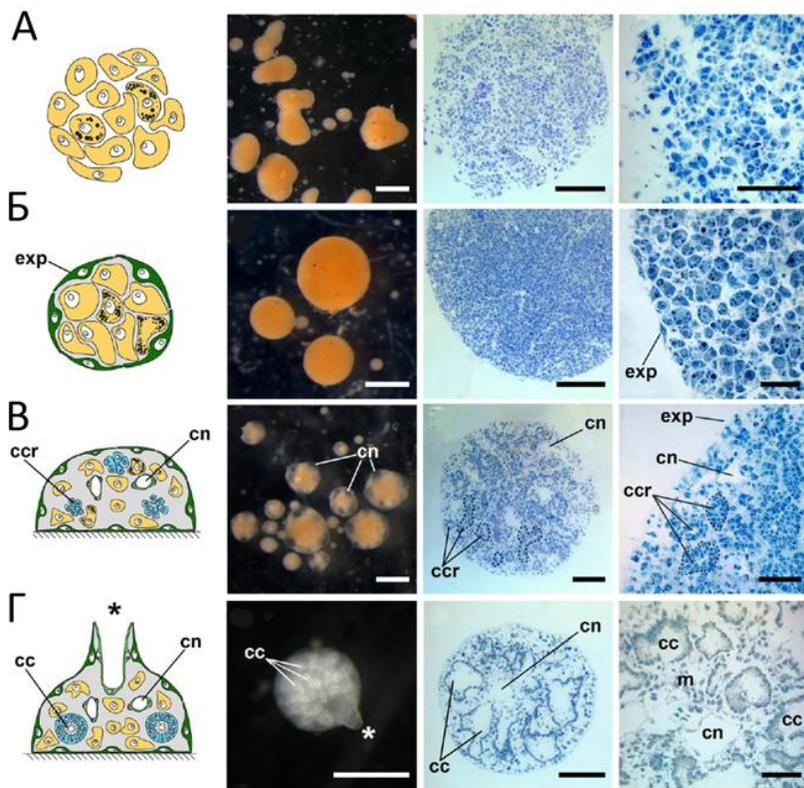


Рисунок 3.5 - Основные этапы реагрегации клеток и развития приморфов у *H. dujardinii*. А - Первичные многоклеточные агрегаты. Б - Истинные приморфы. В - прогрессивно развивающиеся приморфы. сс - зачатки хоаноцитных камер (черным пунктиром), сп — каналы водоносной системы, ехр - экзопинакодерма. Г - Функциональная губка, m-мезохил, оскулюм - звездочка. Даны схематическое изображение стадий; стадии развития *in vivo*, стереомикроскопия; общая гистологическая структура и детали гистологической структуры (световая микроскопия), срезы 1 мкм.

(3) Развивающиеся приморфы (РП), 5+ dpd. После лаг-фазы различной продолжительности, РП начинают развитие, ведущее к реконструкции функциональных губок. Этот процесс начинается с образования многочисленных мелких полостей внутри приморфа. В дальнейшем они дают начало каналам водоносной системы.

(4) Прогрессивно развивающиеся приморфы (ПРП) (рисунок 3.5 В), 7 + dpd. По мере развития внутри ПРП появляются зачатки камер хоаноцитов, представляющие собой плотные сферические группы клеток, которые в дальнейшем дифференцируются в хоаноциты. Одновременно с формированием зачатков хоаноцитарных камер, полости увеличиваются и приобретают эндопинакоцитарную выстилку, характерную для зрелых каналов водоносной системы.

(5) Реконструированные функциональные губки (ФГ) (рисунок 3.5 Г), 10+ dpd. На этом этапе реагрегация клеток заканчивается, и каждый агрегат превращается в функциональную губку с водоносной системой, многочисленными остиями в

экзопинакодерме, развитой сетью каналов и хоаноцитных камер, одной или несколькими оскулярными трубками.

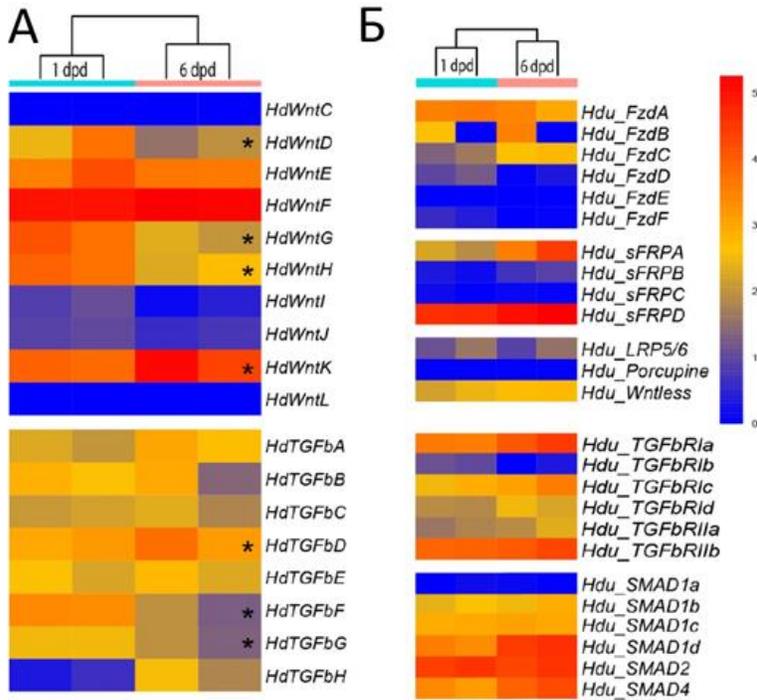


Рисунок 3.6 - Тепловая карта профилей экспрессии генов, компонентов сигнальных путей Wnt и TGF-beta во время реэгрегации клеток у *H. dujardinii*

Показаны две временные точки в двух повторах. (А) Экспрессия лигандов *Wnt* и *TGF-beta*. Транскрипты со значимыми различиями уровня экспрессии между точками ($q < 0,05$) отмечены звездочками (*). (Б) Экспрессия *Frizzled*, *SFRP*, *RP5/6*, *Porcupine*, *Wntless* в верхней части и *TGFbRs* и *SMAD* в нижней. Шкала уровня экспрессии представлена в транскриптах на миллион (TPM).

Мы изучили экспрессию ряда генов в двух временных точках - 1 dpd и 6 dpd, используя метод RNA-seq. Для визуализации экспрессии лигандов Wnt и TGF-beta, рецепторов, LRP5/6, SMAD и других компонентов каскадов, мы создали тепловую карту экспрессии. Нас особенно интересовало, коррелирует ли повышение экспрессии компонентов Wnt и TGF-beta каскадов (включая локализованную) с нарушением радиальной симметрии во время развития примморфа. Большинство генов Wnt (8 из 10) не имеют различий в экспрессии между стадиями (рисунок 3.6). Пять генов (*HduWntD*, *HduWntE*, *HduWntI*, *HduWntJ*, *HduWntK*) экспрессируются на среднем уровне, два гена (*HduWntC*, *HduWntL*) на низком уровне и один ген (*HduWntF*) на высоком уровне на обеих стадиях (рисунок 3.6). Напротив, *HduWntG* и *HduWntH* демонстрируют значительные различия между стадиями. TGF-beta не показывает таких резких различий ни для одного транскрипта. Некоторые различия в уровнях экспрессии наблюдаются между паралогами *Frizzled*, *SFRP*, *SMAD* и рецепторов TGF-beta. *HduFzdA*,

HduSFRPD, *HduTGFbRIa*, *HduTGFbRIIb* и *HduSMAD2* активно экспрессируются на обеих анализируемых стадиях, тогда как *HduFzdD*, *HduFzdE*, *HduFzdF*, *HduSFRPC* и *HduSMAD1a* представлены на минимальных уровнях (рисунок 3.6). Таким образом, мы продемонстрировали, что некоторые молекулы Wnt и TGF-beta дифференциально экспрессируются во время регенерации.

Чтобы определить роль каскадов cWnt и TGF-beta в развитии агрегатов *H. dujardinii*, мы описали пространственные паттерны экспрессии их компонентов на разных стадиях с помощью гибридизации *in situ*. Экспрессия компонентов cWnt была исследована на стадиях 1, 3, 7, 10 и 24 dpd, а экспрессия компонентов TGF-beta - на стадиях 5 и 9 dpd. На рисунке 3.7 представлены паттерны асимметричной экспрессии ряда генов на разных стадиях реагрегации.

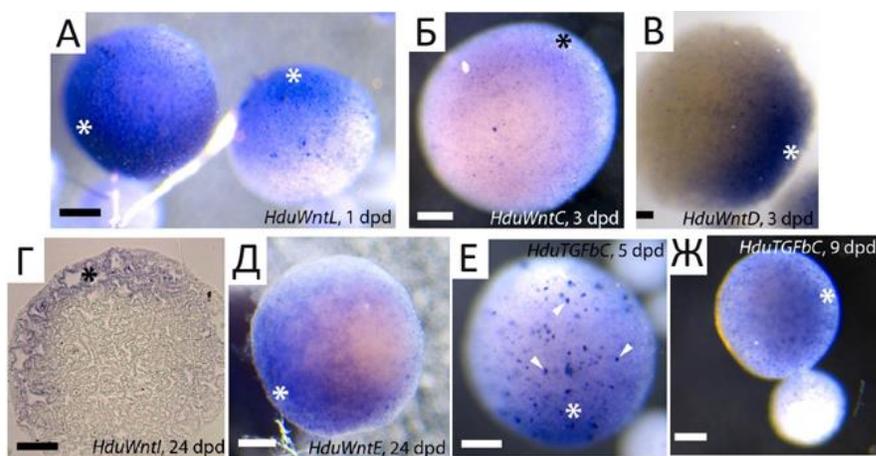


Рисунок 3.7 - Компоненты cWnt и TGF-beta каскадов демонстрируют асимметричный паттерн экспрессии на разных стадиях реагрегации клеток *H. dujardinii*. Звёздочкой отмечена область локальной экспрессии каждого из транскриптов.

Четыре гена (*HduWntC*, *HduWntD*, *HduWntJ* и *HduWntL*) демонстрируют асимметричную экспрессию уже во время формирования экзопинакодермы на стадии 1-3 dpd. На более поздних стадиях (на стадии 10 dpd) эти гены теряют полярную экспрессию. *HduWntD* экспрессируется диффузно, а *HduWntJ* и *HduWntL* экспрессируются в хоаноцитах формирующейся водоносной системы. Семь из восьми исследованных компонентов каскада TGF-beta демонстрировали диффузную экспрессию различной интенсивности на всех исследованных стадиях (1, 3, 6, 9, 12 и 20 dpd). Напротив, *HduTGFbC* демонстрировал небольшое увеличение экспрессии на одном полюсе примморфа на стадиях 5 dpd и 9 dpd. Таким образом, мы можем констатировать динамику паттерна асимметричной экспрессии отдельных компонентов Wnt и TGF-beta на разных стадиях реагрегации клеток *H. dujardinii*.

ПРТ в филогенетически далеких группах происходит за счет различных клеточных и морфогенетических механизмов. Остается неясным, являются ли молекулярные механизмы, управляющие ПРТ, консервативными; все ли молекулярные каскады, вовлеченные в регенерацию, универсальны, или гены, специфичные для таксона, также играют ключевую роль? В 2021 году мы выполнили анализ данных об особенностях и механизмах ПРТ, имеющих в наших собственных исследованиях и в литературе. Удалось классифицировать типы ПРТ губок, выявить консервативные стадии ПРТ, а также выявить основные различия молекулярных и клеточных механизмов ПРТ у разных таксонов губок [6].

Представители 3х классов губок - Demospongiae, Homoscleromorpha и Calcarea - способны к широкому спектру регенеративных процессов: заживлению ран, регенерации частей тела, восстановлению из фрагментов тканей разного размера, восстановлению при reagregации клеток. Сравнительный анализ процессов ПРТ, охарактеризованных в наших оригинальных исследованиях и в литературе, позволил выявить консервативные для губок стадии регенерации. Так, при ПРТ из фрагментов тела наблюдаются: 1-эпителизация раневых поверхностей и потеря первоначальной симметрии; 2-радиализация фрагмента; 3-восстановление водоносной системы и формирование оскулюма (рисунок 3.8).

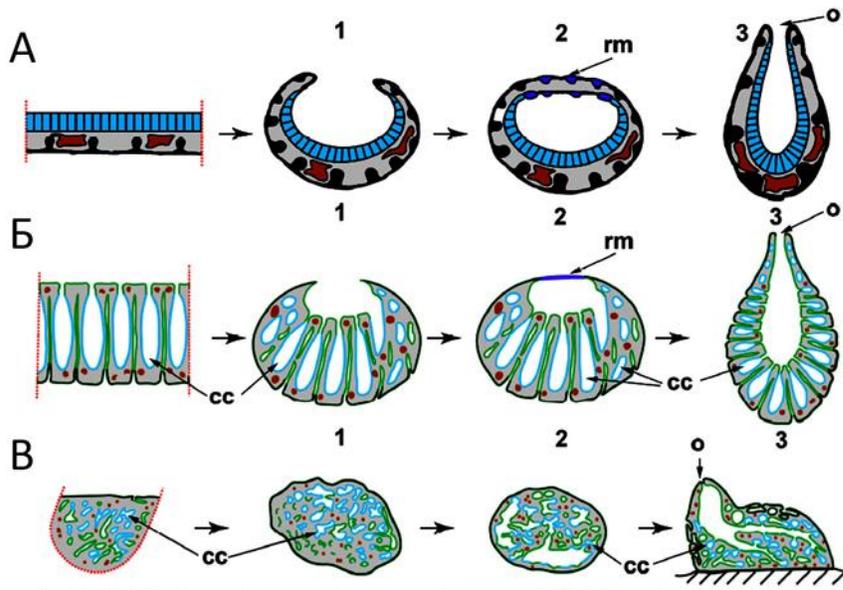


Рисунок 3.8 - ПРТ губок из фрагментов тканей

(А)- асконоидная известковая губка *Leucosolenia* spp.; (Б)- сиконоидная известковая губка *Sycon* sp.; (В)- лейконоидная демоспонгия. Стадии регенерации: 1-эпителизация раневых поверхностей и потеря первоначальной симметрии; 2-радиализация фрагмента; 3-восстановление водоносной системы и формирование оскулюма. cc-камеры хоаноцитов; o-оскулюм; rm-регенеративная мембрана. Красным пунктиром обозначены плоскости срезов губки; темно-зеленым-экзопинакодерма; светло-зеленым-эндопинакодерма; синим-хоанодерма; коричневым-амебоидные клетки мезохила

Реагрегация клеток губки представляет собой один из наиболее ярких примеров ПРТ. В ходе этого процесса из клеточной суспензии формируются многоклеточные агрегаты и воссоздается новая функциональная особь. При ПРТ из агрегата диссоциированных клеток наблюдаются следующие консервативные стадии: 1 - формирование суспензии клеток, состоящей из недифференцированных клеток морфотипа амебоцитов и хоаноцитов; 2 - формирование первичного многоклеточного агрегата; 3 - примморф, эпителизированный агрегат, покрытый непрерывной экзопинакодермой; 4 - примморф с развивающейся водоносной системой; 5 - реконструкция функциональной губки (рисунок 3.5 А - Г).

Анализ собственных и литературных данных показал, что основным фактором реагрегации клеток является псевдоподиальная активность клеток в суспензии. Клетки морфотипа амебоцитов обычно являются наиболее активными и подвижными, в то время как другие клетки могут быть неподвижными или проявлять ограниченную подвижность. Первичные агрегаты начинают трансформироваться в примморфы - эпителизованные агрегаты. Поверхностные клетки агрегата постепенно уплощаются и трансдифференцируются в экзопинакоциты. В эпителизации участвуют клетки как амебоцитного, так и хоаноцитного морфотипов. Во время трансдифференцировки хоаноциты "разбирают" свои воротнички и жгутики. У демоспонгий эпителизация происходит за счет мезенхимально-эпителиального перехода. На заключительной стадии реагрегации примморфы приобретают поры и оскулярные трубки, и начинают активную фильтрацию. С этого момента каждый агрегат превращается в маленькую функциональную губку со всеми необходимыми элементами строения. Однако регенерировавшие губки имеют более простую водоносную систему и демонстрируют организацию типа рагон (у демоспонгий) или олинтус (у известковых губок).

Несмотря на то, что основные этапы ПРТ одинаковы у всех Porifera, губки, принадлежащие к разным филогенетическим кладам (даже к разным видам) и/или отличающиеся по анатомическому строению, используют в ходе одного и того же ПРТ различные морфогенезы. Например, после продольного рассечения восстановление функциональной губки происходит по-разному у известковых губок и демоспонгий. У известковых губок регенерация происходит через срастание краев раны с образованием специфической временной структуры - регенеративной мембраны. У демоспонгий тот же процесс включает только эпителизацию раневой поверхности за счет мезенхимально-

эпителиального перехода. Также неоднократно отмечались различия в механизмах регенерации у близкородственных видов.

Несмотря на большое разнообразие ПРТ, регенеративные способности губок не безграничны. У большинства изученных видов клетки в суспензии либо вообще не агрегируют, либо развитие многоклеточных агрегатов прекращается после их эпителизации. Из более чем 40 изученных видов только 11 могут восстанавливать функциональную губку.

Наиболее специфической чертой ПРТ у губок является нестабильность основной оси тела. Изменение полярности является факультативным при ПРТ после рассечения тела, но обязательным при ПРТ из небольших фрагментов тела и реагрегации клеток. Интересно, что судьба основной оси тела отличается даже у близких видов после одного и того же повреждения. Так, после поперечного рассечения оскулярной трубки у *Leucosolenia complicata* и *L. variabilis*, ось тела изменяется у 12% регенератов первого вида и у 50% регенератов второго.

Молекулярный инструментарий, лежащий в основе формирования оси в процессе регенерации, является общим для различных животных, при этом центральную роль играет сигнальный путь Wnt. Многочисленные дедифференцировки и трансдифференцировки клеток вовлечены в процессы регенерации во всех классах губок. В некоторых случаях регенерация требует мультипотентных клеток: фрагменты демоспонгий не восстанавливаются, если состоят из тканей, лишенных археоцитов и хоаноцитов. Однако плюрипотентные стволовые клетки, участвующие в ПРТ у исследованных классов губок, различны: хоаноциты и пинакоциты у известковых губок, археоциты и хоаноциты у демоспонгий. Причина этого явления должна быть изучена с помощью молекулярных методов.

В 2021 году на основе анализа собственных и литературных данных был выполнен анализ особенностей взрослых стволовых клеток (ВСК) у губок (рисунок 3.9) и у беспозвоночных животных в целом. ВСК у позвоночных и модельных беспозвоночных (например, *Drosophila*) обычно представляют собой долгоживущие, разделенные на линии, клоногенные покоящиеся клетки с соматическими потомками, специфичные для тканей/органов. Такие ВСК встречаются в организме редко, морфологически недифференцированы и подвергаются асимметричному делению. Они характеризуются экспрессией генов "стволовости", могут регулировать гомеостаз, восстановление и регенерацию тканей/органов. Анализ других филогенетических групп показывает, что ВСК присутствуют на разных стадиях онтогенеза, имеют как дифференцированные, так и

недифференцированные фенотипы и могут обладать амeboидным движением. Обычно они плюри/тотипотентные, могут экспрессировать маркеры половых клеток, но часто не могут дифференцироваться в клетки зародышевой линии и, как правило, не имеют дискретных ниш. ВСК могут составлять до 40% клеток животного и участвовать в целом ряде процессов: полной регенерации тела, поддержании гомеостаза, агамном бесполом размножении, постоянном росте.

Тоти/плюрипотентность ВСК у беспозвоночных поддерживает такие функции, как гаметогенез, эмбриогенез, гомеостаз, бесполое размножение и регенерацию. В отличие от позвоночных, соматические и зародышевые маркеры стволовости (например, *Vasa*, *Pl10*, *Piwi*, *Nanos*, *Bruno*, *Pumilio*, *Tudor* и др.), а также щелочная фосфатаза коэкспрессируются в дифференцированных соматических клетках/тканях во многих группах беспозвоночных (рисунок 3.10). Этот признак зарегистрирован у губок, кишечнополостных, гребневиков, аннелид, паразитических ракообразных, моллюсков и иглокожих и колониальных туникат. Это может означать либо либо плеiotропию этих генов, либо их различные функции в дифференцированных соматических клетках. Это может говорить и о том, что представление о специфических "генах стволовых клеток" должно быть пересмотрено.

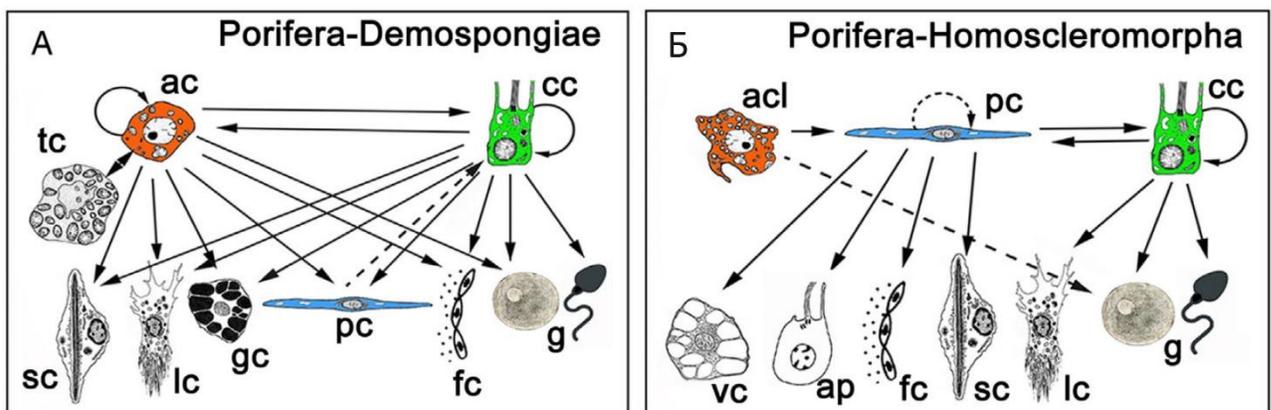


Рисунок 3.9 - Способность ВСК губок к пластичности, самовозобновлению и дифференцировкам

Подчеркиваются различия между группами *Demospongia* и *Homoscleromorpha*. ac - архециты, cc - хоаноциты, pc - пинакоциты, acl - подобные архецитам клетки, ap - апопиллярные клетки, fc - фолликулярные клетки, gc - гранулярные клетки, lc - лобоциты, sc - склероциты, tc - тессоциты, vc - вакуолизованные клетки.

Были выявлены общие транскриптомные сигнатуры для архецитов губок демоспонгий, необластов плоских червей и i-клеток *Hydra*. Оказалось, что существует 180 групп ортологов, которые рассматриваются как хорошее косвенное свидетельство существования "базового набора" генов, экспрессировавшихся в предковых стволовых

клетках [27]. Большинство этих генов возникли еще до появления животных, и лишь некоторые из них представляют собой настоящие инновации Metazoa. Результаты проведенного анализа подтверждают идею о консервативной предковой генетической программе мультипотентности, связанной с плюри/тотипотентностью [28] (рисунок 3.10). Однако надо учитывать, что предполагаемые геновые регуляторные сети были перестроены в ходе эволюции в связи с формированием специфических для той или иной группы морфологии / физиологии. Эти данные согласуются с гипотезой о существовании "предковых" стволовых клеток [29]. Интересно, что транскриптомный ландшафт предковых стволовых клеток [27] беден транскрипционными факторами, но богат компонентами РНК-регуляции, включая многие РНК-связывающие белки (типичные регуляторы эмбриональных стволовых клеток млекопитающих).

		RNA-binding proteins	RRM containing proteins	Signal transduction	Transcription factors	Cell cycle/differentiation regulators	Niche
		<i>argonaute</i> <i>pivi</i> <i>vasa</i> <i>vig/pil0</i> <i>DDX1/6</i> <i>tudor</i> <i>pumilio</i> <i>nanos</i> <i>mago nashi</i>	<i>bruno/bnili</i> <i>boule</i> <i>mbnl</i> <i>Musashi/dazap</i>	<i>Wnt</i> pathway <i>Notch</i> pathway <i>TGFβ/BMP</i> pathway	<i>Pax</i> <i>POU</i> <i>Sox</i> <i>Fox</i> <i>GATA4/5/6</i> <i>Myc</i> Transcript silencers	<i>MCM2</i> <i>Cyclins</i> <i>PCNA/pH3</i>	Niche interaction
METAZOA	BILATERIA						
	Acoelomorpha	✓			✓	✓	✓
	Platyhelminthes	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Annelida	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Mollusca	✓					
	Arthropoda	✓					
	Urochordata	✓		✓	✓	✓	✓
	Cephalochordata			✓	✓	✓	✓
	Hemichordata						✓
	Echinodermata	✓				✓	✓
	Cnidaria	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Porifera	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Ctenophora	✓					
Placozoa	✓						

Рисунок 3.10 - Экспрессия генов "стволовости" в соматических клетках беспозвоночных. Изображены пять функциональных категорий генов, каждая из которых представлена 3-9 специфическими генами (в серых квадратах). Типы Bilateria сгруппированы по цвету: розовый цвет для Deuterostomia (Chordata и Ambulacraria), синий (Spiralia) и желтый (Ecdysozoa) для Protostomia. Галочки указывают на то, что экспрессия генов стволовости в ВСК по крайней мере у одного вида данного типа была зарегистрирована. Обратите внимание, что для большинства типов животных и многих категорий генов данные отсутствуют. Включены только те таксоны, по которым имеется достаточная информация о ВСК. Красный череп и скрещенные кости указывают на отсутствие/потерю гена(ов) у типа. RRM - мотив РНК-распознавания.

В работе предложена модель, согласно которой тотипотентные ВСК могут перемещаться по "лестницам стволовости", так что стволовость тотипотентной клетки может сохраняться в течение всего онтогенеза, но никогда не приобретает ни верхних, ни нижних значений. На любом этапе этого "путешествия" ВСК могут спускаться на более низкий уровень стволовости, к полностью дифференцированному состоянию (через уровни мультипотентности и унипотентности). Клетки с любым статусом стволовости могут возвращаться к тотипотентности, даже из полностью дифференцированного состояния. Они также могут менять статус стволовости через трансдифференцировку и/или дедифференцировку. Однако такой спектр потенциалов характерен для стволовых клеток не всех Metazoa. ВСК позвоночных представляют собой только один, и не самый типичный, подтип ВСК животных.

3.3.3 Изучение морфомеханики эмбриональных тканей [9]

Для количественного описания деформаций эпиэктодермы супрабластопоральной области (СБО) в ходе гастрюляции *Xenopus laevis*, мы провели анализ пространственного распределения скоростей смещений клеток в области СБО, включающей 88 клеток (рисунок 3.11 А). На момент начала съёмки эмбрион достиг стадии 10,5. На данной стадии начинается интернализация колбовидных клеток на дорсальной стороне эмбриона, а бластопор начинает распространяться в латеральных направлениях, формируя латеральные губы (рисунок 3.11 А' и А'', стрелки).

Для количественного исследования пространственной анизотропии тканевых деформаций использовали параметр порядка S , позволяющий выявить регионы с наименее сонаправленными смещениями клеток, и потому наиболее выраженными деформациями. Выраженность деформации зависит от направления движения клеток и от того, на какое расстояние они расходятся при смещении. Поэтому необходимо соотнести значение скорости смещения клеток (V) со значением параметра порядка (S).

Изначально скорости смещения клеток были равномерно распределены вдоль медиолатеральной оси СБО. В течение наблюдения скорости смещений принимали наибольшие значения в медиальной или наиболее латеральных областях губы СБО, формируя градиент вдоль медиолатеральной оси. Чтобы статистически оценить пространственную неоднородность скоростей движения клеток, мы подразделили исследуемую область на 3 региона, каждый из которых состоял из 29-30 клеток (рисунок 3.11 Б).

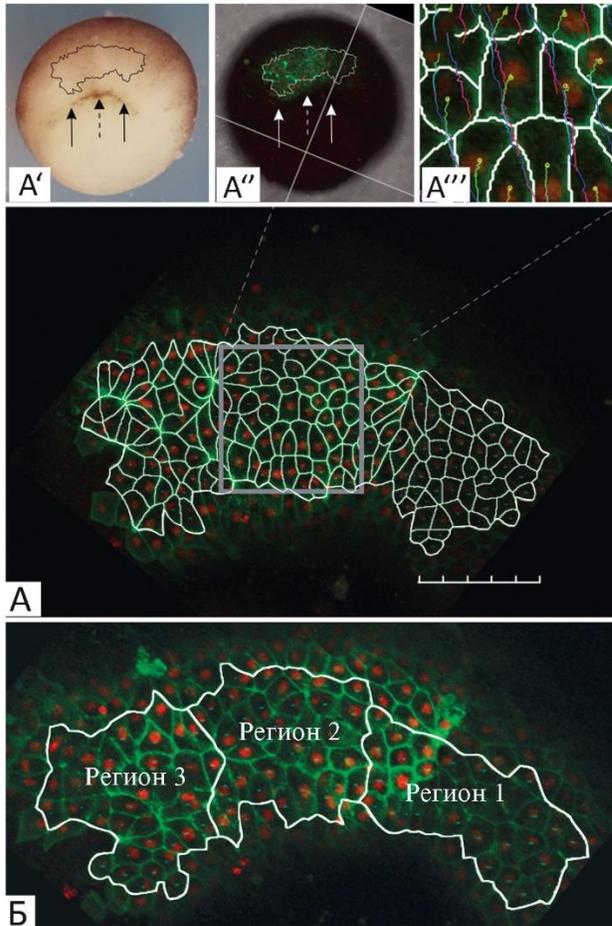


Рисунок 3.11 - Количественное описание деформаций эпиэктодермы супраблестопоральной области (СБО) в ходе гаструляции *Xenopus laevis*

А - Общий вид дорсальной области эмбриона *X. laevis* на стадии 10–10.5 с распознанными клеточными границами (А, линейка соответствует 100 мкм, деление – 20 мкм) и положение исследуемой области в эмбрионе (А', А''). Для каждой из распознанных клеток (А) была прослежена траектория ее смещения в течение часа (А'''). Для каждой траектории цветовым кодом обозначены ее начальный (желто-зеленый интервал), промежуточный (сине-фиолетовый интервал) и конечный (оранжево-красный интервал) участки. Б - Для оценки динамики пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси вся исследуемая область была разбита на три региона по 29–30 клеток.

Для каждого из трех регионов проследили динамику средней скорости смещений клеток и среднего параметра порядка S . Абсолютные значения средней скорости движения клеток в регионе 3 превышают таковые в регионах 1 и 2, и в течение первых 15-18 минут съёмки возрастают. Кроме того, значение параметра порядка в регионе 3 систематически превышает среднее по всем клеткам образца в течение первых 6 минут наблюдения.

На интервале 6-24 мин наблюдения параметр порядка S возрастает во всех регионах, а его колебания уменьшаются. Одновременно с этим возрастают и скорости движения клеток.

В области 31-й минуты наблюдения значения параметра порядка в регионах 1 и 2 начинают превышать таковые в регионе 3. С 47-й минуты наблюдения среднее значения параметра порядка в регионе 3 начинает статистически достоверно отличаться от среднего по зародышу в меньшую сторону. Одновременно с этим в регионе 3 замедляется рост средней скорости смещения клеток, начиная с 27-й минуты.), а в регионах 1 и 2 рост средней скорости продолжается. Таким образом, скорости и сонаправленность движений клеток в регионе 3 систематически отличается от регионов 1 и 2.

Чтобы найти причину выявленной неоднородности движений клеток, мы проанализировали форму границ клеток на полученной серии изображений в каждом из трёх регионов. Нам не удалось выявить статистически значимых различий между средним значением эксцентриситета клеток в начале и в конце наблюдения, как в целом по эмбриону, так и внутри отдельных регионов. Однако анализ формы клеток позволил выявить множество клеточных структур, называемых розетками. Подобные структуры являются промежуточным этапом пространственно ориентированных переупаковок клеток (рисунок 3.12 А – А’’’). Розетка формируется за счёт сокращения общих границ внутри группы клеток, выстроенных в два параллельных тяжа (рисунок 3.12 А). Каждая клетка сокращает свою границу (рисунок 3.12 А’) так, что на оптическом срезе граница контакта между клетками двух тяжей сходится в точку (рисунок 3.12 А’’). Затем, клетки розетки группируются в два новых тяжа, перпендикулярных ориентации первоначальных тяжей (рисунок 3.12 А’’’). Такие клеточные переупаковки могут опосредовать аксиальное удлинение эмбриона. Чтобы оценить, как переупаковки клеток через розетки соотносятся с картой механических напряжений в гастрюляции *X. laevis*, мы проследили переупаковки клеток розеток в исследуемой области.

На кадрах съёмки удалось идентифицировать 9 розеток, из них 7 были локализованы в регионе 3, 1 – в регионе 2, и 1 – в регионе 1. Таким образом, розетки преимущественно формировались в регионе 3, который соответствует медиальной зоне СБО - области зародыша с наиболее активными инволюционными движениями. Была проанализирована динамика распада розеток в СБО (рисунок 3.12 Б-Б’’’). Данные об ориентации клеточных границ между формирующихся при распаде розетки тяжами клеток могут помочь в оценке внутритканевой деформации. Эти границы в СБО оказались практически параллельно передне-задней оси эмбриона, отклоняясь от неё на $5,1^\circ - 8,6^\circ$. Согласно картам механических напряжений [30], эти границы также параллельны линиям напряжения внутри СБО. Это позволяет предположить, что наблюдаемые клеточные перестройки компенсируют усиленное растяжение поверхностного слоя клеток в ходе инволюции. Действительно, наибольшее

значение средней скорости движений клеток было зафиксировано в регионе формирования розеток. В дальнейшем мы планируем детально изучить цикл формирования розеток - описать кинематически и изучить лежащий в его основе клеточный механизм, так как его понимание позволит косвенно оценить распределения сил в ходе формирования розетки.

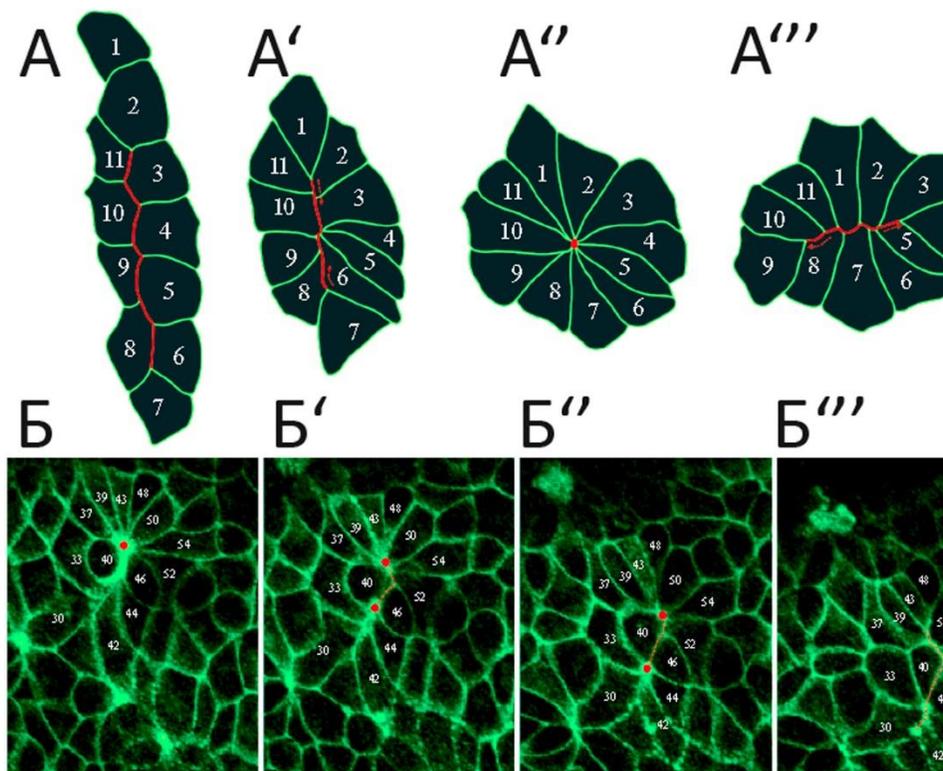


Рисунок 3.12 - Формирование клеточных розеток в ходе планарной интеркаляции
 А - А''' Схема формирования и распада клеточной розетки у *D. melanogaster* (по Blankenship et al., 2006). Красная линия – граница контакта между клетками двух тяжей, пунктирные красные стрелки – направление сокращения/формирования границы между клетками двух тяжей, красная точка – центр розетки. Б-Б''' Последовательные этапы распада клеточной розетки у *X. laevis*. Числа в клетках (белый шрифт) - обозначают порядковый номер клетки, красная точка – центр розетки, красная пунктирная линия – формирующаяся новая граница контакта между клетками розетки.

3.4 Заключение

В 2021 году мы получили новые данные о молекулярных и клеточных механизмах формирования плана строения у базальных Metazoa - книдарий и губок. Изучались процессы нормального развития в эмбриогенезе морского гидроида *Dynamena pumila* и развитие агрегатов диссоциированных клеток губки *Halisarca dujardini*.

Наше исследование [4] показало, что у *D. pumila* гастрюляция протекает как комбинация первичной и вторичной деляминации, как и у некоторых других видов Hydrozoa. Однако у *D. pumila* гастрюляция имеет уникальные особенности и связана с крайне высоким уровнем морфологической изменчивости. Гастрюляционные морфогенезы и спецификация зародышевых листков не связаны с молекулярной разметкой плана строения, основанной на активности cWnt. Морфологическая ось тела формируется на поздних стадиях эмбрионального развития *D. pumila* и очень устойчива по отношению к изменениям активности cWnt. Дальнейшее изучение *D. pumila* может значительно расширить наше понимание связей между морфогенезом и молекулярным паттернингом плана строения Metazoa.

В нашей работе детально описано динамическое изменение паттернов экспрессии компонентов сигнальных каскадов cWnt и TGF-beta в ходе развития агрегатов клеток губки *Halisarca dujardini* [5]. Полученные данные позволяют предположить, что спецификация новых осей и их формирование происходит у агрегатов при участии каскадов cWnt и TGF-beta. Являются ли эти каскады триггерами, запускающими формирование нового организма? Какие процессы клеточного уровня связывают их активацию с формированием поляризованного тела губки de novo? Как локализованный паттерн экспрессии возникает из гомогенного? На все эти вопросы еще только предстоит ответить.

На основании собственных и литературных данных мы охарактеризовали молекулярные и клеточные механизмы, вовлеченные в полную регенерацию тела (ПРТ) губок [6]. Удалось классифицировать типы ПРТ губок, выявить консервативные стадии ПРТ, а также выявить основные различия молекулярных и клеточных механизмов ПРТ у разных таксонов губок. Также были проанализированы особенности взрослых стволовых клеток (ВСК), играющих ключевую роль в регенерации, у губок и других беспозвоночных животных [7]. В работе предложена модель, согласно которой ВСК с любым статусом стволовости могут возвращаться к тотипотентности, даже из полностью дифференцированного состояния. Они также могут менять статус стволовости через трансдифференцировку и/или дедифференцировку. Сделан вывод, что ВСК позвоночных представляют собой только один, жи не самый типичный, подтип ВСК Metazoa животных.

Было также проведено изучение ряда аспектов морфомеханики гастрюляции представителя позвоночных животных, *Xenopus laevis* [9]. Впервые описана пространственная неоднородность движений клеток эпизктодермы гастрюлы, которая может служить источником деформации тканей супрабластопоральной области (СБО). Мы

осуществили детальное количественное описание движений клеток СБО. Анализ формы клеток позволил выявить региональные различия в активности их перегруппировок. Мы сделали вывод, что такие перегруппировки компенсируют растяжение материала СБО в ходе инволюции.

3.5 Список использованных источников

1. Hobmayer B.; Rentzsch F.; Kuhn K.; Happel C.M.; von Laue C.C.; Snyder P.; Rothbacher U.; Holstein T.W. WNT Signalling Molecules Act in Axis Formation in the Diploblastic Metazoan Hydra // Nature. 2000. Vol. 407. P. 186–189.
2. Petersen C.P.; Reddien P.W. A Wound-Induced Wnt Expression Program Controls Planarian Regeneration Polarity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. Vol. 106. P. 17061–17066.
3. Manuel M. Early Evolution of Symmetry and Polarity in Metazoan Body Plans // Comptes Rendus Biol. 2009. Vol. 332. P. 184–209.
4. Vetrova A.A., Lebedeva T.S., Saidova A.A., Kupaeva D.M., Kraus Y.A., Kremnyov S.V. From apolar gastrula to polarized larva: embryonic development of a marine hydroid, *Dynamena pumila* // Developmental Dynamics. 2021. <https://doi.org/10.1002/dvdy.439>
5. Borisenko I., Bolshakov F.V., Ereskovsky A.3, Lavrov A.I. Expression of Wnt and Tgf-beta pathway components during whole-body regeneration from cell aggregates in demosponge *halisarca dujardini*//Genes. 2021. Vol. 12. Is. 6. Art. no. 944. <<https://www.mdpi.com/2073-4425/12/6/944>> DOI 10.3390/genes12060944.
6. Ereskovsky, A.; Borisenko, I.E.; Bolshakov, F.V.; Lavrov, A.I. Whole-Body Regeneration in Sponges: Diversity, Fine Mechanisms, and Future Prospects // Genes. 2021. Vol. 12. Art. no. 506.
7. Rinkevich B., Ballarin L., Martinez P., Somorjai I., Ben-Hamo O., Borisenko I., Berezikov E., Ereskovsky A., Gazave E., Khnykin D., Manni L. A pan-metazoan concept for adult stem cells: the wobbling Penrose landscape // Biological Reviews. 2021. <https://doi.org/10.1111/brv.12801>
8. Belousov 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.
9. Bredov D.V., Volodyaev I.V., Luchinskaya N.N. Spatio-Temporal Dynamics of Embryonic Tissue Deformations during Gastrulation in *Xenopus laevis*: Morphometric Analysis // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. № 5. P. 277–286. DOI: 10.1134/S1062360421050027.

10. Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Kraus Yu., Technau U. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis* // *Dev. Biol.* 2007. Vol. 310. № 2. P. 264 – 279.
11. Kupaeva D.M., Vetrova A.A., Kraus Y.A., Kremnyov S.V. Epithelial folding in the morphogenesis of the colonial marine hydrozoan, *Dynamena pumila* // *BioSystems*. 2018. Vol. 173. P. 157-164.
12. von Dassow G. Some simple methods and tips for embryology. 2010. https://gvondassow.com/Research_Site/Methods_files/
13. Kupaeva D., Konorov E., Kremnyov S. De novo transcriptome sequencing of the thecate colonial hydrozoan, *Dynamena pumila* // *Marine Genomics*. 2020. Vol. 51. Art.no.100726.
14. Genikhovich G., Technau U. In situ hybridization of starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*) embryos, larvae, and polyps // *Cold Spring Harb Protoc.* 2009. Vol.9. pdb.prot5282
15. Borisenko I.; Adamsk, M.; Ereskovsky A.; Adamska M. Surprisingly Rich Repertoire of Wnt Genes in the Demosponge *Halisarca Dujardini* // *BMC Evol. Biol.* 2016. Vol. 16. P. 123.
16. Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin). 1967.
17. Kraus Y., Flici H., Hensel K., Plickert G., Leitz T., Frank U. The embryonic development of the cnidarian *Hydractinia echinata* // *Evolution & Development*. 2014. Vol. 16. №6. P. 323 – 338.
18. Li J., Zhang S., Soto X., Woolner S., Amaya E. ERK and phosphoinositide 3-kinase temporally coordinate different modes of actin-based motility during embryonic wound healing // *J Cell Sci.* 2013. Vol. 126(21). P. 5005-5017.
19. Teissier G. Etude experimentale du developpement de quelques Hydraries // *Ann. Sci. Natur. Zool.* 1931. Ser. 10. Vol. 14. P. 5 – 60.
20. Pare A.C., Zallen J.A. Cellular, molecular, and biophysical control of epithelial cell intercalation // *Current topics in developmental biology*. Vol. 2020. Is.136. P.167-193.
21. Keller R, Sutherland A. Convergent extension in the amphibian, *Xenopus laevis*. *Current topics in developmental biology*. 2020. Vol. 136. P. 271-317.
22. Kraus Yu.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in cnidarian embryos // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. Vol. 50. P. 267-275.
23. Lee P.N., Pang K., Matus D.Q., Martindale M.Q. A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. Vol. 17. P. 157– 167.
24. 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.

25. Plickert G., Jacoby V., Frank U., Muller W.A., Mokady O. Wnt signaling in hydroid development: Formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning // *Dev. Biol.* 2006. Vol. 298. P. 368 – 378.
26. Adamska, M.; Degnan, S.M.; Green, K.M.; Adamski, M.; Craigie, A.; Larroux, C.; Degnan, B.M. Wnt and TGF-beta Expression in the Sponge *Amphimedon queenslandica* and the Origin of Metazoan Embryonic Patterning // *PLoS ONE*. 2007. Vol. 2. Art.no. e1031.
27. Alié A., Hayashi T., Sugimura I., Manuel M., Sugano W., Mano A., Satoh N., Agata K., Funayama N. The ancestral gene repertoire of animal stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112. Is. 51. P. E7093-100.
28. Fierro-Constaín L., Schenkelaars Q., Gazave E., Haguenaer A., Rocher C., Ereskovsky A., Borchiellini C., Renard E. The conservation of the germline multipotency program, from sponges to vertebrates: a stepping stone to understanding the somatic and germline origins // *Genome biology and evolution*. 2017. Vol. 9(3). P. 474-88.
29. Solana J. Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis // *Evodevo*, 2013. Vol. 4(1). P.1-17.
30. Belousov L.V. Morphogenesis on the Multicellular Level: Patterns of Mechanical Stresses and Main Modes of Collective Cell Behavior // *Morphomechanics of Development* / Ed. L. V. Belousov. Cham: Springer. 2015. P. 75–111.

РАЗДЕЛ 4. МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ГОМЕОСТАЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ОРГАНИЗМА

Общее введение

Одна из важных проблем регуляции онтогенеза связана с анализом механизмов поддержания гомеостаза при развитии организма в меняющихся условиях среды. В рамках этой проблемы изучаются не только изменяющиеся факторы внешней среды, но и изменение среды при переходе от эмбрионального к личиночному развитию, при рождении эмбриона млекопитающих, вылуплении эмбриона птиц.

В ходе эволюции выработались механизмы, позволяющие компенсировать влияние факторов внешней среды, которые оказывают значительное (часто критическое) воздействие на физиологические и метаболические реакции, размножение и развитие животных. Основной целью работы является изучение влияния факторов внешней среды на характеристики процессов роста и метаболизма в онтогенезе позвоночных и беспозвоночных животных. Работа сфокусирована на исследовании защитных механизмов, позволяющих поддерживать гомеостаз в условиях воздействия повреждающих факторов, таких как гипоксия; на выявлении стадий развития, на которых влияние повреждающих факторов становится обратимым, то есть появляются защитные механизмы. Эти исследования в 2021 году выполнялись на следующих модельных системах: эмбрионы птиц, развивающиеся в условиях гипоксии; личинки амфибий и пресноводные моллюски из популяций, обитающих в разных климатических условиях.

Поддержание гомеостаза цитоскелета — существенный раздел гомеостатических механизмов, обеспечивающих стабильность индивидуального развития. В мышечных и немышечных клетках основным фактором, формирующим цитоскелет, является актомиозиновый комплекс основные функции которого регулируются тропомиозинами. В 2021 году проводилось исследование термостабильности изоформ тропомиозинов из мышц кроликов с помощью современных методов калориметрии. Это дало возможность с большой точностью измерять термостабильность белков и на основе этих данных судить об их структуре.

Подраздел 4.1. Влияние факторов среды на физиологические параметры развивающегося организма

4.1.1 Введение

При изучении популяций животных в естественной среде обитания выявляются межпопуляционные различия фенотипических признаков, направленные против градиента условий среды. В том числе, наблюдается адаптивная изменчивость признаков эмбрионов и личинок, которую можно рассматривать как "подстройку" онтогенеза к условиям среды. Так, на представителях двух широкоареальных видов бурых лягушек – остромордой (*Rana arvalis* Nilss.) и травяной (*Rana temporaria* L.), показано, что в южных популяциях обоих видов темп развития головастиков выше, чем в северных. По-видимому, эти различия обусловлены разной температурой мест обитания. Однако в лабораторных условиях при одинаковой температуре содержания, особи из северных популяций развивались быстрее, чем из южных [1, 2]. Вопрос о том, в какой мере такие важные свойства организма как темп развития и интенсивность метаболизма закреплены генетически, а в какой представлены нормой реакции в пределах диапазона толерантности вида, до сих пор открыт. Задачей нашей работы было изучение интенсивности метаболизма головастиков остромордой лягушки, происходящих из двух популяций, обитающих на разной широте (условно – более южной и более северной), при их выращивании в стандартных лабораторных условиях [3].

Воздействие гипоксических условий во время эмбриогенеза - повреждающий фактор, влияющий на рост эмбриона, смертность, морфологию, физиологию и поведение, а также на многие аспекты жизни взрослого животного. Первая реакция эмбриона на острое воздействие гипоксии - физиологическая реакция сердечно-сосудистой системы, состоящая из изменения артериального давления, частоты сердечных сокращений (ЧСС) и перераспределения кровотока между различными тканями и органами. Эта реакция аналогична реакции физиологического стресса и считается защитной, направленной на временное сохранение функции эмбрионального гомеостаза до восстановления нормальных условий. Возникает вопрос, как гипоксический ответ зависит от стадии развития? Чтобы ответить на этот вопрос, мы обобщили все доступные данные из литературы об изменениях в ответе сердечного ритма куриного эмбриона на острую гипоксию.

4.1.2 Материалы и методы

4.1.2.1 Исследование интенсивности метаболизма головастика остромордой лягушки из популяций, обитающих на разной широте

В качестве материала были использованы по 4 группы полных sibсов, полученные в результате экспериментальных скрещиваний половозрелых особей остромордой лягушки, отловленных в каждой из двух исследованных популяций в нерестовых водоемах в период размножения. Место отлова особей из первой популяции находилось в Брянской обл. ($52^{\circ}27' N$; $33^{\circ}53' E$), длительность сезона активности – 7 мес. Местообитание второй популяции – Московская обл. ($55^{\circ}44' N$, $36^{\circ}51' E$), длительность сезона активности – 6 мес., начало размножения – в среднем на 2 недели позднее [1]. В каждой популяции были отловлены по 2 самки и по 2 самца. В результате контролируемых перекрестных скрещиваний, от родителей каждой из двух исследованных популяций было получено по 4 различные группы потомков – полных sibсов (таблица 4.1.1). Оплодотворенные яйца содержали в емкостях с уровнем воды 5 см, при температуре около $15^{\circ}C$ до достижения 39-й стадии (начало активного питания по таблицам нормального развития травяной лягушки по [4]). Затем головастика рассаживали по 20 экз. от каждой группы sibсов в 2 аквариума емкостью 20 л каждый. Дальнейшее выращивание головастика во всех аквариумах проводили при постоянной температуре $20^{\circ}C$ и при одинаковом режиме кормления кормом для декоративных рыб фирмы TetraMin, а также сушеным гаммарусом и вареной крапивой. Для определения интенсивности потребления кислорода использовали по 20 экз. от каждой из 4 групп sibсов, происходящих из двух популяций, всего 160 экз. Определение интенсивности потребления кислорода головастиками проводили на стадиях 46–47 [4]. Измерения производили с помощью оксиметра Orion Star A323 RDO/DO meter (Thermo Fisher Scientific Inc.). Головастика по одному экземпляру помещали в герметичную стеклянную камеру, из которой сразу отбирали 1 мл воды для измерения начальной концентрации кислорода. Отбор пробы производили таким образом, чтобы в камере осталось ровно 20 мл воды и отсутствовали пузырьки воздуха. Через 20 мин из камеры отбирали вторую пробу воды для измерения концентрации кислорода. Для заполнения камер использовали воду из аквариума, в котором содержался данный экземпляр. Контролем служили 2–3 камеры объемом 20 мл без объектов, заполненные водой из того же аквариума. Интервал времени между отборами проб измеряли с точностью до 1 мин. Скорость потребления кислорода вычисляли для камеры индивидуально, затем вносили поправку на потребление кислорода микробиотой, вычитая среднее значение скорости потребления кислорода в камерах без объекта. По окончании

измерения потребления кислорода каждого головастика взвешивали с точностью до 10 мг и затем возвращали в аквариум. Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Достоверность различий между средними для популяций значениями оценивали с помощью двухфакторного иерархического дисперсионного анализа, в котором первым фактором (включающим в себя градации второго фактора) были “популяции”, вторым фактором – группы полных sibсов. Достоверность различий между средними значениями потомства разных самцов и разных самок в пределах каждой из двух популяций оценивали с помощью трехфакторного дисперсионного анализа, с факторами “самки”, “самцы” и “повторности” (схема с полной классификацией).

4.1.2.2 Исследование реакции эмбрионов птицы на гипоксию.

Для ответа на вопрос о том, как адаптивная реакция эмбриона птиц на гипоксию зависит от его стадии развития, мы рассмотрели и систематизировали современные данные о реакции изменения ЧСС куриного зародыша на острую гипоксию и особенностях этой реакции в зависимости от стадии развития. Приводили метаанализ литературных и наших данных, которые были получены при острой гипоксии 15%, 10%, 5%, 0% O₂ и длительности от 5 мин до 4-х часов [6-16].

4.1.3 Результаты и обсуждение

4.1.3.1 Исследование интенсивности метаболизма головастика остромордой лягушки из популяций, обитающих на разной широте.

Продолжительность развития от оплодотворения до стадии 47 составила в потомстве популяции из Брянской обл. 43.5 сут, из Московской обл. – 36.5 сут. Различия средних составляют 19.2% и достоверны ($p < 0.001$). Не обнаружено достоверных межпопуляционных различий по среднему значению массы тела головастика на стадии 46–47 (таблица 4.1.1).

Результаты измерения интенсивности потребления кислорода оказались сходными по величине с известными из научной литературы данными для близкого вида – травяной лягушки [5]. Обнаружены достоверные различия средних значений потребления кислорода головастиками из разных популяций в расчете на особь и на единицу массы тела. Оба показателя были достоверно выше (при $p < 0.0001$) у потомства родителей, взятых из Московской обл., на 13.5 и 14.8% соответственно (таблица 4.1.1). Скорость прироста массы тела также была выше у головастика популяции Московской обл. на 15.6% ($p < 0.0001$).

Таблица 4.1.1 - Масса тела, средний прирост массы и скорость потребления кислорода головастиками остромордой лягушки. Выделены жирным шрифтом пары средних для популяций значений, достоверно различающиеся между собой, n – объем выборки; $\bar{x} \pm st.er.$ – среднее \pm стандартная ошибка. * – Достоверно отличаются от аналогичных величин у остальных групп данной популяции.

Популяция	Группа		n	Вес головастика (мг)	Потребление кислорода		Средний прирост массы тела (мг сутки ⁻¹)
	♀	♂			на особь (мл мин ⁻¹)	на грамм веса (мл г ⁻¹ мин ⁻¹)	
					$\bar{x} \pm st.er.$	$\bar{x} \pm st.er.$	$\bar{x} \pm st.er.$
Брянская обл.	1	1	20	698.8 ± 27.2	0.886 ± 0.062	1.280 ± 0.082	16.05 ± 0.61
		2	20	710.0 ± 30.9	0.942 ± 0.053	1.352 ± 0.077	16.32 ± 0.71
	2	1	20	687.5 ± 12.0	0.875 ± 0.032	1.291 ± 0.054	15.80 ± 0.27
		2	20	695.0 ± 19.2	0.986 ± 0.029	1.426 ± 0.037	15.98 ± 0.45
	Все вместе		80	697.8 ± 11.5	0.922 ± 0.023	1.337 ± 0.033	16.04 ± 0.26
Московская обл.	3	3	20	654.0 ± 14.0	1.085 ± 0.039	1.667 ± 0.060	17.68 ± 0.38
		4	20	677.5 ± 13.5	1.025 ± 0.028	1.516 ± 0.035	18.31 ± 0.36
	4	3	20	670.5 ± 16.3	1.012 ± 0.036	1.514 ± 0.049	18.63 ± 0.45
		4	20	735.0 ± 17.3*	1.101 ± 0.027	1.506 ± 0.038	20.42 ± 0.48*
	Все вместе		80	684.2 ± 8.3	1.056 ± 0.017	1.551 ± 0.024	18.76 ± 0.24

В пределах популяции из Брянской обл. не было выявлено различий между потомством двух самок и между потомством двух самцов по средним значениям всех четырех изучаемых характеристик (таблица 4.1.1). В пределах популяции из Московской обл. средние значения массы тела и скорости ее прироста у потомков самки 2 и самца 2 было достоверно больше, чем у трех других групп потомков (таблица 4.1.1). Не выявлено различий между потомством двух самок и между потомством двух самцов по средним значениям потребления кислорода на особь и по средним значениям потребления кислород на грамм массы тела, что указывает на отсутствие влияния на них материнского эффекта. Отсутствие влияния самцов на эти характеристики метаболизма в обеих популяциях означает низкую аддитивную изменчивость, что принято интерпретировать как достаточно жесткий контроль отбором по данным признакам.

Достоверные различия по продолжительности развития до 47 стадии при одинаковой температуре содержания указывают на устойчивые межпопуляционные различия темпов развития остромордой лягушки из Брянской и Московской областей. Результаты проведенных ранее исследований темпов развития и роста головастиков в лаборатории при таких же условиях (20С и начальная плотность 1 особь на 1 л) из тех же популяций показали, что головастики из Брянской обл. развивались достоверно медленнее, но были несколько

крупнее более северных конспецификов из Московской обл. Продолжительность развития от оплодотворения до завершения метаморфоза составляла 53.6 и 49.7 суток соответственно, а длина тела после завершения метаморфоза равнялась 14.52 и 13.88 мм соответственно [1]. В нашем эксперименте соотношение массы тела головастиков сохраняло данную тенденцию, хотя различия не были достоверны.

4.1.3.2 Исследование реакции эмбрионов птицы на гипоксию.

Проведенный нами метаанализ изменения реакции сердечного ритма куриного эмбриона на острую гипоксию в эмбриогенезе показал четыре четких периодов этой реакции. При любом из изученных уровней острой гипоксии для трех первых периодов развития была характерна брадикардия. При этом с увеличением возраста зародыша ингибирующее действие гипоксии на ЧСС прогрессивно возрастало в течение первого периода (от 2 сут (D2) до D7; ~ 10-30% от общей длительности эмбриогенеза до выклева на 21 сут) и уменьшилась во втором периоде (D8-D11; ~ 30-50% эмбрионального развития). В течение третьего периода (D12-D18; ~ 50-85% эмбрионального развития) реакция ЧСС на гипоксию зависела от уровня гипоксии, но не зависела от возраста эмбриона. И, наконец, четвертый период (D19-D21; ~ 90% эмбрионального развития до выклева) характеризовался отсутствием определенной зависимости наблюдаемой реакции ЧСС как от дня развития, так и от уровня гипоксии. Эти данные четырех периодов представлены на рисунке 4.1.1 Б.

При этом также было показано, что базовая ЧСС (при нормоксии) увеличивается в первый период со скоростью 22,9 уд/мин в день, остается стабильной во второй период, медленно увеличивается со скоростью 3,6 уд/мин в день в течение третьего периода и остается стабильной или даже немного снижается (-1,5 уд/мин в день) во время четвертого периода (рисунок 4.1.1 А).

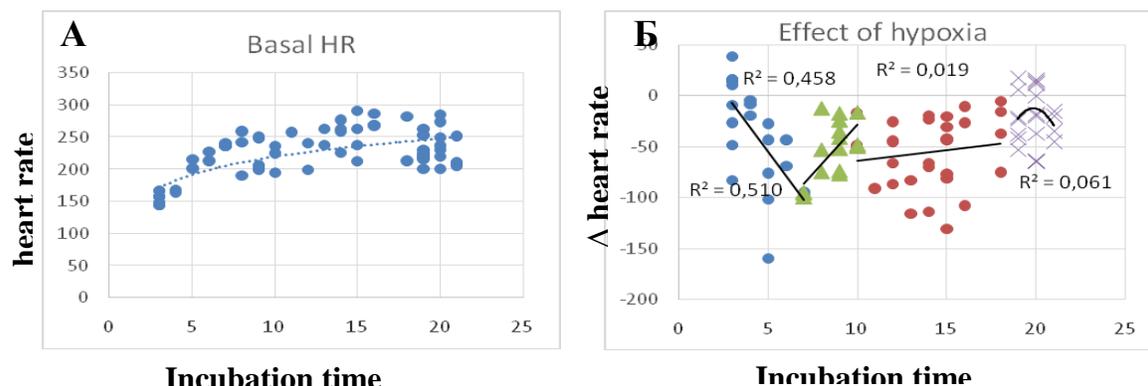


Рисунок 4.1.1 - Суммарные данные метаанализа литературных данных изменения ЧСС в эмбриогенезе куриного зародыша в нормоксии (А) и 4 периода изменения гипоксического ответа ЧСС куриного зародыша при гипоксии 15%,10%,5%,0% O₂ (Б)

На графике (Б) данные изменения ЧСС при острой гипоксии в первый период – синие кружки, второй период – зеленые треугольники, третий период – красные кружки, синие крестики – четвертый период. Отмечены соответствующие линии тренда и величину достоверности аппроксимации (R). Ноль соответствует величине ЧСС в нормоксии.

Что вызывает эти изменения гипоксического ответа ЧСС во время и между описанными выше периодами, и каковы механизмы за это отвечают, еще предстоит определить. Предположительно, наблюдаемые изменения ответа ЧСС на острую гипоксию связаны с развитием и созреванием сердечно-сосудистой и дыхательной системы эмбриона, а также с формированием нейрогормонального контроля сердца. Мы также рассматриваем как вероятные причины: рост эмбриона и связанное с ним увеличение потребности в кислороде (первый период), увеличение сродства к O₂ крови эмбриона (второй период), формирование гуморального симпатического контроля сердца (третий период) и постепенный переход к легочному дыханию и функционирование нервного компонента симпатического контроля сердца (четвертый период). Эти данные мы представили на международной конференции «The 47th annual meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society, 2021».

Наиболее отчетливо эти 4 периода изменения гипоксического ответа ЧСС в эмбриогенезе куриного зародыша удалось выявить при острой гипоксии 10-11%O₂ (рисунок 4.1.2).

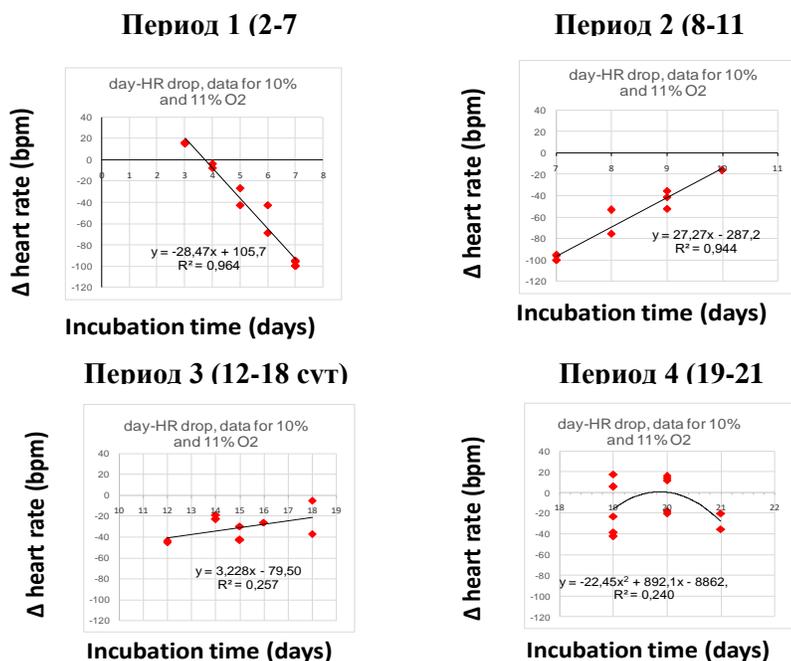


Рисунок 4.1.2 - Изменение ЧСС куриного зародыша при острой гипоксии 10%- 11% O₂ в разные периоды развития куриного зародыша
 На четырех графиках представлены данные изменение ЧСС при гипоксии в 1, 2, 3 и 4 периодах, и отмечены соответствующие линии тренда и величину достоверности аппроксимации (R).

4.1.4 Заключение

Исследована интенсивность метаболизма головастиков остромордой лягушки из популяций, обитающих на разной широте. Полученные нами результаты показали четкую направленность различий в потреблении кислорода. У головастиков из популяции с более длительным сезоном активности этот показатель достоверно ниже в сравнении с особями из более северной популяции. Такой результат вполне ожидаем, исходя из установленного ранее факта более высокой скорости роста головастиков из популяций со сравнительно коротким сезоном активности [1] Сохранение этого соотношения при развитии головастиков в лабораторных условиях при одинаковой температуре указывает на то, что особенности их физиологии, задающие разный темп развития в популяциях, вероятно, закреплены генетически

В ходе исследования реакции эмбрионов птицы на гипоксию было обнаружено 4 периода в изменение гипоксического ответа ЧСС: 2-7 сут, 8-11 сут, 12-18 сут и 19-21 сут инкубации. Эти периоды отличаются по динамике изменения ингибиторного эффекта острой

гипоксии на ЧСС зародыша: он прогрессивно возрастает в первый период, уменьшается во втором периоде, не зависит от возраста во время третьего периода, и во время четвертого периода отсутствует определенная зависимость от возраста зародыша. Предположительно, изменения характеристик ответа ЧСС на острую гипоксию во время и между этими периодами связаны с развитием сердечно-сосудистой и дыхательной системы эмбриона, а также с формированием нейрогормонального контроля работы сердца. Необходимы дальнейшие исследования для определения механизмов, лежащих в основе изменения ингибиторного гипоксического эффекта во время этих периодов.

4.1.5 Список использованных источников

1. Ляпков С.М., Корнилова М.Б., Сербинова И.А., Корзун Е.В., Новицкий Р.В. Формирование направленной географической изменчивости особенностей жизненного цикла бурых лягушек // Современная герпетология. 2009. Т. 9. № 3/4. С. 103–121.
2. Ляпков С.М. Географическая изменчивость характеристик метаморфов травяных лягушек // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2016. Вып. 3. С. 86–91.
3. Lyapkov S.M., Kleymenov S.Y. Interpopulational Differences in the Developmental Rate and Oxygen Consumption in Tadpoles of Moor Frog (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia) // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. P. 125–128. DOI: 10.1134/S106236042102003X.
4. Дабагян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. 1975. С. 442–462.
5. Lindgren B., Laurila A. Physiological variation along a geographical gradient: is growth rate correlated with routine metabolic rate in *Rana temporaria* tadpoles? // Biological J. Linnean Society. 2009. V. 98. P. 217–224.
6. Tazawa H. Effect of O₂ and CO₂ in N₂, He, and SF₆ on chick embryo blood pressure and heart rate // J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol. – 1981. – Vol. 51. P.1017–1022
7. Van Golde J., Mulder T., van Straaten H., Blanco C. The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43 // Pediatr. Res. – 1996. –Vol. 40. P. 867–871
8. 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

9. 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
10. Crossley D., Burggren W., Altimiras J. Cardiovascular regulation during hypoxia in embryos of the domestic chicken *Gallus gallus* // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. P. 219–226
11. Khandoker A., Dzialowski E., Burggren W., Tazawa H. Cardiac rhythms of late pre-pipped and pipped chick embryos exposed to altered oxygen environments // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2003. – Vol. 136. P. 289–299
12. 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.
13. Mortola J., Marinescu D., Pierre A., Artman L. Metabolic and heart rate responses to hypoxia in early chicken embryos in the transition from diffusive to convective gas transport // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 181. P.109–117
14. Jonker S., Giraud G., Espinoza H., Davis E., Crossley 2nd D. 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
15. Ide S., Ide R., Mortola J. The contribution of heart rate to the oxygen consumption of the chicken embryo during cold- or hypoxia-hypometabolism // *Comp. Biochem. Physiol. A* – 2017. – Vol. 203. P. 49–58.
16. 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

Подраздел 4.2. Изучение структурных и функциональных особенностей тропомиозинов, в том числе анализ мутаций, влияющих на строение и функционирование этих белков сократительного комплекса

4.2.1 Введение

Тропомиозин (Трм) является ассоциированным с актином белком и ключевым регулятором структуры и динамики актиновых нитей как в мышечных, так и в немышечных клетках. Молекула Трм представляет собой α -спиральный белковый димер, который образует непрерывный полимер с актиновой нитью вдоль ее поверхности и регулирует стабильность и динамику этой структуры. В немышечных клетках Трм участвует во многих жизненно важных процессах, таких как морфогенез и дифференцировка тканей, транспорт везикул внутри клетки [1], клеточная адгезия [2, 3] и др.

Одна из важнейших функций тропомиозина в немышечных клетках - регуляция формирования цитоскелета, обеспечивающая поддержание гомеостаза на уровне формы клеток и их движения в ходе морфогенетических процессов. В этом контексте существенным представляется изучение структурных и функциональных особенностей тропомиозинов, в том числе анализ мутаций, влияющих на строение и функционирование этих белков сократительного комплекса.

В клетках млекопитающих насчитывается более 40 изоформ Трм, которые уникальным образом взаимодействуют с цитоскелетом, обеспечивая контролируемую пространственную и временную регуляцию динамики актиновых нитей. Среди них многочисленные низкомолекулярные (LMW) немышечные изоформы Трм, содержащие ~247 остатков, являются продуктами гена TPM3 [4]. В настоящем исследовании проведен анализ структурных и функциональных свойств пяти изоформ LMW, полученных из гена TPM3 (Трм3.1, Трм3.2, Трм3.4, Трм3.5 и Трм3.7). Все эти изоформы используют N-концевой экзон 1b и отличаются друг от друга в терминальном экзоне 6 (6a или 6b) и C-концевой экзон 9 (9a, 9c или 9d) [4]. Большинство данных изоформ Трм экспрессируются в нейрональных клетках, включая специфические для мозга изоформы.

Тогда как цитоплазматические изоформы Трм (Трм1.5, Трм 1.6, Трм1.7, Трм1.12 и Трм 4.2), которые являются продуктами двух разных генов, TPM1 и TPM4, значительно различаются альтернативно сплайсированными N-концевыми экзонами 1a2b или 1b, и внутренними экзонами 6a или 6b и C-концевыми экзонами 9a, 9c или 9d [5].

В гене TPM3 тропомиозина были обнаружены многочисленные точечные мутации, связанные с генезом различных наследственных заболеваний медленных скелетных мышц. Две из этих мутаций, R91P и R245G, связаны с таким заболеванием, как врожденная диспропорция волокон (CFTD) [6]. Это заболевание представляет собой относительно редкую врожденную миопатию, характеризующуюся гипотонией и генерализованной мышечной слабостью, которая влияет на способность пациентов ходить в детском возрасте, вызывает дыхательную недостаточность и сколиоз. Из гистологических данных диагноз CFTD основан на наличии гипотрофии мышечных волокон с медленным подергиванием при отсутствии других заметных патологических отклонений [7]. Несмотря на описание мутаций R91P и R245G, очень мало было известно об их влиянии на структурные и функциональные свойства Трм медленной скелетной мышцы. Кроме того, еще ничего не было известно о влиянии мутаций R91P и R245G на структура молекулы Трм.

Было показано, что мутация R245G уменьшает сродство Трм к актину [7], однако авторы использовали изоформу α -Трм вместо γ -Трм. Также было показано, что мутации R91P и R245G влияют на регуляторные свойства γ -Трм: мутация R245G уменьшается чувствительность к Ca^{++} скорости скольжения тонких филаментов, сконструированных из F-актина, TPM и Tn при моделировании подвижности *in vitro* [8], в то время как мутация R91P увеличилась чувствительность к Ca^{++} -АТФазной активности миозиновых головок при их взаимодействии с реконструированными тонкими филаментами.

С помощью поляризоационной флуориметрии было показано, что мутация R91P может влиять на положение γ -Трм на поверхности актиновой нити и увеличивать количество головок миозина, прочно связанных с актином как при высокой, так и при низкой концентрации Ca^{2+} [9]. Следует отметить, что все эти исследования проводились с миозином и Tn, извлеченными из быстрой скелетной мышцы, в то время как регуляторные свойства медленной скелетной мышцы остаются мало изученными. Было показано, что Трм существенно зависит от того, какой миозин и Tn, быстрый или медленный, использовались в эксперименте.

Цели работы:

1. Исследование влияния альтернативно сплайсированных экзонов 6 и 9 на структурные и функциональные свойства различных LMW изоформы Трм, полученные из гена TPM3.

2. Изучение связи изменений вторичной и третичной структуры тропомиозина с развитием синдрома генерализованной мышечной слабости из-за врожденной диспропорции волокон (CFTD)

4.2.2 Материалы и методы

Белковые препараты. Рекомбинантные белки, кодирующие последовательности которых были коммерчески синтезированы в компании Eurogen (Москва, Россия) и клонированы в вектор pet23a+. Все изученные изоформы Тpm содержали остатки Cys и были восстановлены перед экспериментами путем нагревания при 60°C в течение 20 мин в присутствии 3 мм дитиотриэтола (DTT). После такой процедуры все эти образцы Тpm находились в полностью восстановленном состоянии.

Актин скелетных мышц кролика был получен стандартным методом [10]. F-актин, полимеризованный добавлением 4 мм MgCl₂ и 100 мм KCl, дополнительно стабилизировали добавлением фаллоидина (Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Миссури, США) в молярном соотношении 1:1.

Конструкция Тpm для медленной скелетной мышцы γ -(Тpm3.12) была получена путем синтеза кодирующей последовательности, полученной в компании "Евроген" (Москва). Мутанты R91P и R245G g-Тpm были получены путем экспрессии в бактериальной плазмиде pMW172 методом ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза с использованием ДНК-полимеразы Q5 (NEB, Ипсвич, Массачусетс, США). Для мутагенеза были использованы следующие олигонуклеотиды:

5' -GGCCTCCTTGAACCCCTAGGATCCAGC (вперед) и

5' -ACCTCAGCCTCAGCATCAGCAGC (смежный) для R91P, и

5' -GCTGAGGGATCGGTAGCCAAGCTGG (вперед) и

5' -AAACTCAGCACGGGTCTCTGCCTCCTT (смежный) для R245G.

(Мутантные кодоны подчеркнуты).

Продукты ПЦР были клонированы и секвенированы для проверки замены. Все рекомбинантные виды Тpm были получены в *E. coli* C41 (DE3) в культурах и очищены, как описано ранее [11]. Актин получали из *m. psoas* кролика по стандартной методике [12]. После полимеризации нитчатый актин (F-актин) стабилизировали добавлением 1,5-кратного молярного избытка фаллоидина. Для экспериментов по анализу подвижности *in vitro* F-актин был помечен 2-кратным молярным избытком ТРИТЦ-фаллоидина (Сигма, Сент-Луис, Миссури, США). Медленный миозин скелетных мышц. Комплексы Тn были получены из *m. soleus* кролика стандартными методами [13].

Спектры CD в дальнем ультрафиолетовом диапазоне различных видов Трм (1,0 мг/мл) регистрировали при 5°C на CD-спектрометре Chirascan (Великобритания) в ячейках 0,02 см. Спектры CD были практически идентичны для всех образцов Трм и показали два отрицательных пика при 208 и 222 нм, типичных для α -спиральных белков. Измерения тепловой денатурации были выполнены путем отслеживания молярной эллиптичности Трм при 222 нм в диапазоне температур от 5°C до 65°C при постоянной скорости нагрева 1°C/мин. Все измерения проводились в 30 мм буфере Hepes-Na, pH 7,3, содержащем 100 мМ NaCl и 2 мМ DTT.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC). Эксперименты ДСК были проведены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре (Malvern Instruments, Нортгемптон, Массачусетс 01060, США) при скорости нагрева 1 К/мин в 30 мм буфере Hepes-Na, pH 7,3, содержащем 100 мМ NaCl и 2 мМ DTT. Концентрация белка составляла 2 мг/мл.

Все виды Трм были восстановлены перед экспериментами DSC путем нагревания при 70°C в течение 20 минут в присутствии 3 мМ DTT. После такой процедуры все образцы Трм находились в полностью восстановленном состоянии. Термическое разложение всех гомодимеров $\gamma\gamma$ -Трм было полностью обратимым, что позволило провести деконволюционный анализ кривых сорбции тепла, т. е. их разложение на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены).

Измерения вязкости. Измерения вязкости проводились на микровязкозиметре AMVn (Anton Paar, Вирджиния, США) в капилляре объемом 0,5 мл при 20 °C. Удельную плотность растворов Трм измеряли с помощью прибора DMA 4500 (Anton Paar, Вирджиния, США) и учитывали для точного расчета вязкости. Все измерения проводились при концентрации Трм 1,0 или 2,0 мг/мл в 30 мм буфере Hepes-Na (pH 7,3) с добавлением 100 мМ NaCl и 2 мМ DTT.

Соосаждение Трм с F-актином и термическая диссоциация их комплексов. Сродство различных изоформ Трм к актину оценивали, используя анализ коседиментации. Термически индуцированная диссоциация комплексов Трм с F-актином, стабилизированным фаллоидином, была выявлена по изменениям рассеяния света при 90° при 350 нм на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian Australia Pty Ltd, Малгрейв, Виктория, Австралия).

Измерения жесткости филаментов актин-Трм с помощью двухлучевой оптической ловушки. Актиновые нити, содержащие Трм, были получены путем смешивания F-актина с ТПМ при молярном отношении 1:10 в буферный раствор АБ (25 мМ хлористого калия, 25 мМ

имидазол, 4 мм MgCl₂, 1 мм ЭГТА, и 20 мм ДТТ, pH 7,5) КОН содержащих 0,5 мг/мл БСА и очистная система кислорода (0,2 мг/мл оксидаза глюкозы, 0,05 мг/мл каталазы, и 3 мг/мл раствора глюкозы).

Температурные зависимости светорассеяния. Исследования термически индуцированной диссоциации комплексов Trm с F-актином, который стабилизирован фаллоидином, проводились при 350 нм на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian Australia Pty Ltd, Малгрейв, Виктория, Австралия) оснащенном регулятором температуры и термозондами. Все измерения проводились при постоянной скорости нагрева 1°C/мин. Светорассеяние растворов F-актина, содержащих ту же концентрацию актина (20 мкм), что и в образцах TrmF-актина, было измерено перед экспериментами. Термически индуцированная диссоциация Trm от F-актина сопровождалась снижением интенсивности рассеяния света, и поэтому температура, при которой происходит диссоциация, может предоставить важную информацию о стабильности комплексов Trm с F-актином. Температурная зависимость рассеяния света свободного F-актина была вычтена из экспериментальных кривых; после этого они анализировались путем подгонки к сигмоидальной функции распада Больцмана. Основным параметром, извлеченным из этого анализа, является температура диссоциации, т. е. температура, при которой происходит уменьшение рассеяния света на 50 %.

Анализ подвижности филаментов in vitro. Измерения скоростей скольжения регулируемых тонких филаментов при различных концентрациях Ca⁺⁺ были выполнены на основе анализа подвижности *in vitro* при 30°C. Регулируемые тонкие филаменты были восстановлены путем добавления 100 нм гомодимера $\gamma\gamma$ -Trm и 100 нм Tn медленной скелетной мышцы к 10 нм F-актину, меченному тритцефаллоидином, и помещены в экспериментальную проточную ячейку с медленным скелетным мышечным миозином, неподвижным на внутренней поверхности, покрытой нитроцеллюлозой. Эксперименты с каждым мутантом Trm были повторены три раза с миозином, приготовленным *de novo*.

4.2.3. Результаты и обсуждение

Термическая денатурация изоформ Trm (исследования CD и DSC). Измерения эллиптичности при 222 нм методом кругового дихроизма (CD) в процессе тепловой денатурации изоформ Trm, которая отражает содержание α -спиралей в молекуле Trm, показали, что термическая стабильность Trm3.2 и Trm3.4 была заметно выше, чем у других исследованных Trm (рисунок 4.2.1). Точки перегиба на кривой эллиптичности наблюдались

при ~ 46 °C для Трм3.1, при ~ 50 °C для Трм3.5 и Трм3.7, при ~ 53 °C для Трм3.2 и при ~ 55 °C для Трм3.4. Таким образом, различия в термостабильности этих изоформ Трм отражают отличия их пространственной структуры [14].

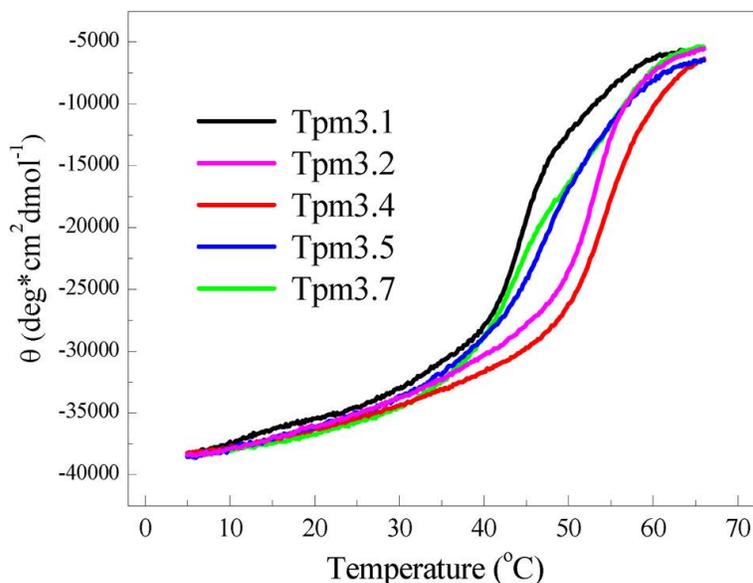


Рисунок 4.2.1 - Тепловая денатурация изоформ Трм по данным CD (кругового дихроизма) при 222 нм при постоянной скорости нагрева 1 °C/мин и концентрации 1 мг/мл

Исследование изоформ Трм 3.2 и 3.4 методом DSC показало наличие трёх калориметрических доменов (рисунок 4.2.2 А и Б). При этом значение T_{max} для этого домена у изоформ Трм3.2 и 3,4 (50 - 51.5 °C) (таблица 4.2.1) значительно превысил эти величины для Трм3.1 и Трм3.7 (44 °C) [20](13). Таким образом, результаты DSC показали, что термическая стабильность изоформ Трм3.2 и Трм3.4 значительно выше, чем у Трм3.1 и Трм3.7, что согласуется с результатами CD.

Таблица 4.2.1. Анализ калориметрических доменов разных изоформ тропомиозинов: Трп3.2, Трп3.4 и Трп3.5

Трп isoform	T_m^a (°C)	ΔH_{cal} (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{cal} (% of total)	Total ΔH_{cal}^b (kJ mol ⁻¹)
Трп 3.2				1170
Domain 1	47.5	230	19	
Domain 2	49.6	640	55	
Domain 3	56.4	300	26	
Трп 3.4				1210
Domain 1	45.9	150	12	
Domain 2	51.3	590	49	
Domain 3	58.5	470	39	
Трп 3.5				1510
Domain 1	38.1	200	13	
Domain 2	43.6	430	29	
Domain 3	50.5	550	36	
Domain 4	57.7	330	22	

Изоформы Трп3.1 и Трп3.2 с одинаковым С-концевым экзоном 9d отличаются друг от друга только экзоном 6 (6a в Трп3.1 и 6b в Трп3.2) (рисунок 4.2.1). Эти изоформы Трп значительно отличаются своей термостабильностью, измеренной с помощью CD (рисунок 4.2.1). Это различие связано с термостабильностью калориметрической области 2, которая была намного выше (на 6 °C) для Трп3.2, чем с для Трп3.1. Калориметрическая область 2 на профиле DSC соответствует, вероятнее всего, термической денатурации С-концевой участка молекулы Трп. Таким образом, можно сделать вывод, согласно которому внутренний экзон 6b в Трп3.2 отвечает за высокую термическую стабильность С-концевого участка изоформы Трп. Экзоны 6a и 6b значительно отличаются друг от друга по аминокислотными последовательностям [4]. Среди 25 остатков экзона 6 в экзоне 6b Трп3.2 16 остатков заменены по сравнению с экзоном 6a изоформы Трп3.1. Многие из этих остатков локализованы в позициях a и d гептадной структуры α -спирали, т.е. отвечают за стабилизацию спиральной структуры тропомиозина.

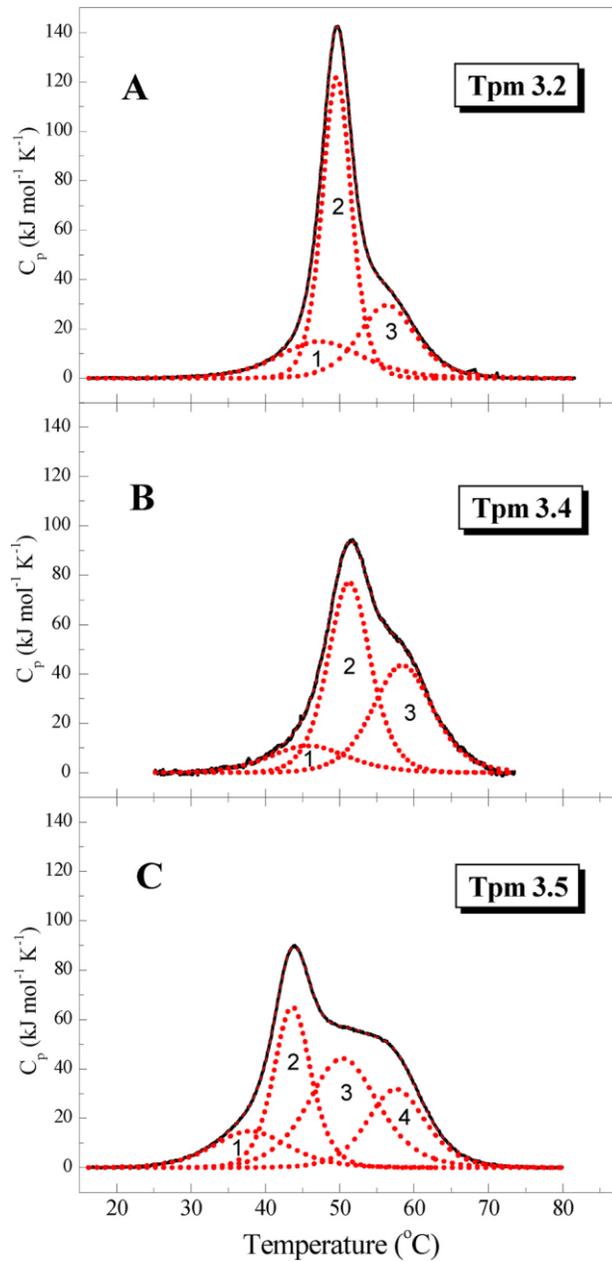


Рисунок 4.2.2 - Температурная зависимость избыточной теплоемкости (C_p) и деконволюция кривых теплопоглощения различных изоформ тропомиозина. Сплошные линии – экспериментальные данные, пунктирные линии – отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные в результате деконволюции.

Изоформы Trm3.1 и Trm3.2 не различались по сродству к F-актину. Однако, как стабильность, так и жесткость на изгиб Trm сом плекса с F-актином был выше для Trm3.2, чем для Trm3.1. Таким образом, замена экзона 6а в Trm3.1 на экзон 6б в Trm3.2 привел к

значительным изменениям не только в структурных, но и в функциональных свойствах молекулы Тpm.

Влияние замен R91P и R245G на структуру молекулы Тpm. Применяя различные методы, мы изучили и сравнили свойства гомодимеров $\gamma\gamma$ -Тpm медленных скелетных мышц, несущих мутации R91P или R245G в обеих γ -цепях. Мы изучили также влияние мутаций R91P или R245G на взаимодействие актин-миозин с использованием миозина и тропонина (Тn) из медленных скелетных мышц. Результаты показывают, что как эти мутации, так и особенно R91P, приводят к значительным структурным изменениям в молекуле $\gamma\gamma$ -Тpm и вызывают серьезные изменения функциональных свойств $\gamma\gamma$ -Тpm [15].

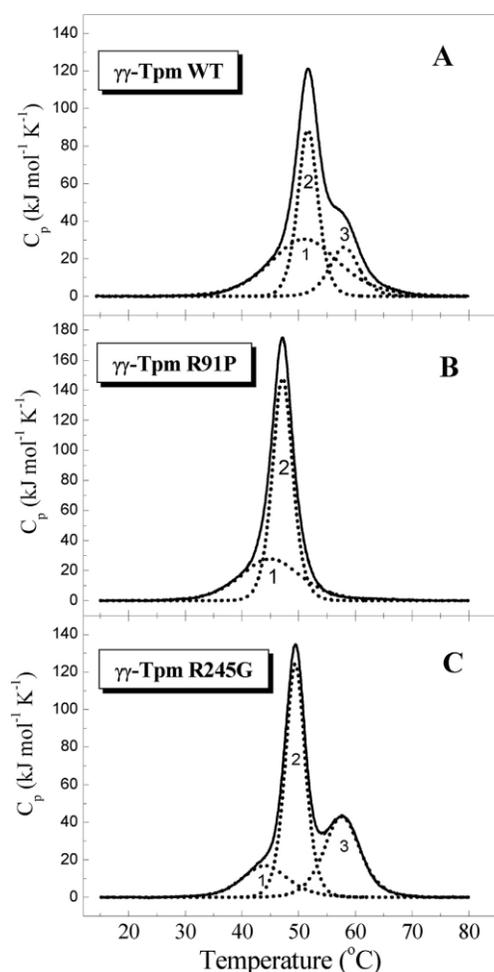


Рисунок 4.2.3 - Температурная зависимость избыточной теплоёмкости (C_p) по данным ДСК и результат деконволюции кривых теплопоглощения $\gamma\gamma$ -гомодимеров тропомиозина (A) — WT; и трёх мутантных форм R91P — (B) и R245G (C)

Сплошные линии — экспериментальные данные; пунктир — отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные в результате деконволюции.

Мы применили DSC для исследования влияния мутаций R91P и R245G на тепловое развертывание и доменную структуру молекулы $\gamma\gamma$ -Trm. На рисунке 4.2.3 показаны кривые избыточной теплоемкости, полученные методом DSC для $\gamma\gamma$ -Trm с мутациями по сравнению с контрольным $\gamma\gamma$ -Trm, а также результаты их деконволюции в отдельные тепловые переходы, соответствующие отдельным калориметрическим доменам молекулы Trm. Основные калориметрические параметры для этих областей (температура перехода, Tmax и калориметрическая энтальпия, ΔH_{cal}) обобщены в таблице 4.2.2.

Таблица 4.2.2 – Калориметрические параметры по данным ДСК для индивидуальных тепловых переходов (калориметрических доменов) $\gamma\gamma$ -гомомеров Trm WT и Trm с мутациями R91 в обеих $\gamma\gamma$ -цепях Trm

$\gamma\gamma$ -Trm	Tmax (°C)	ΔH_{cal} (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{cal} (% of total)	Total ΔH_{cal} (kJ mol ⁻¹)
$\gamma\gamma$ -Trm WT				1090
Domain 1	51.1	490	45	
Domain 2	51.6	420	39	
Domain 3	58.0	180	16	
$\gamma\gamma$ -Trm R91P				1090
Domain 1	45.1	390	36	
Domain 2	47.1	700	64	
$\gamma\gamma$ -Trm R245G				1115
Domain 1	44.1	180	16	
Domain 2	49.4	575	52	
Domain 3	57.6	360	32	

Мутация R91P вызвала значительные структурные изменения в молекуле $\gamma\gamma$ -Trm, которые выразились в полном исчезновении на термограмме DSC пика $\gamma\gamma$ -Trm, соответствующего в Trm наиболее термостабильной калориметрической области 3 (рисунок 4.2.3 B). Это изменение также сдвинуло тепловой переход домена 2 на 4,5 °C к более низкой температуре и сильно увеличило энтальпию данного домена. Эти результаты показали, что

мутация R91P сильно дестабилизирует как N-, так и C-концевые участки молекулы Trm. В результате эти участки молекулы плавятся при гораздо более низкой температуре, и их тепловые переходы совпадают по позиции, что дает новый переход (область 2 на рисунке 4.2.3 В) с более низкой температурой денатурации и более высокой калориметрической энтальпией (таблица 4.2.2). Напротив, мутация R245G дестабилизировала только C-концевую часть молекулы Trm, сдвинув ее тепловой переход (домен 2 на рисунке 4.2.1 С) более чем на 2°C в сторону более низкой температуры, без видимого влияния на тепловое разворачивание N-концевой части молекулы (домен 3 на рисунке 4.2.3 С).

Наши результаты показали, что добавление Ala-Ser, имитирующее N-концевое ацетилирование Trm не оказывает заметного влияния на свойства немышечных LMW изоформ [14]. В этом отношении эти изоформы Trm сильно отличаются от мышечных HMW изоформ Trm с N-концевым экзоном 1a, которые не могут полимеризоваться способом "голова к хвосту" и связывать актин без N-концевого ацетилирования или расширения Ala-Ser. Неацетилированные виды Trm с N-концевым экзоном 1b связывают актин даже с более высоким сродством, чем N-терминально ацетилированные виды с экзоном 1a [16]. Эта разница в свойствах изоформ LMW и HMW Trm, продуктов TPM3 или Гены TPM1, можно объяснить значительной разницей между N-терминальными последовательностями экзонов 1b и 1a в этих генах.

Следует отметить, что в наших экспериментах по взаимодействию изоформ Trm3 с F-актином мы использовали легкодоступную изоформу α -актина скелетных мышц, но не немышечный β - или γ -актин. Однако в предыдущих исследованиях было обнаружено, что сродство Trm3.1 к цитоскелетному F-актину (85% β -изоформы/ и 5% γ -изоформы) было по существу таким же, как и у скелетного F-актина [17]. Поэтому представляется маловероятным, что взаимодействие изоформ Trm3 с F-актином существенно зависит от того, какая изоформа актина, скелетная или цитоскелетная, использовалась в экспериментах.

4.2.4 Заключение

Таким образом, в нашей работе было показано, что мутации R91P и R245G в димере $\gamma\gamma$ -Trm меняют характеристики взаимодействия F-актина с медленным миозином и их кальциевую регуляцию в присутствии медленного мышечного тропонина. Нарушения активации тонких филаментов, вызванные мутациями R91P и R245G в $\gamma\gamma$ -Trm приводит к мышечной слабости, наблюдаемой при CFTD. Эти изменения функциональных свойств $\gamma\gamma$ -Trm и значительные структурные изменения молекулы $\gamma\gamma$ -Trm, вызванные этими мутациями,

объясняют молекулярный механизм наследственного заболевания медленных скелетных мышц.

Выявленные различия между различными изоформами Тpm могут быть важны в дальнейших исследованиях, для понимания, почему эти изоформы, включая нейронные и специфические для мозга изоформы, уникальным образом взаимодействуют с актиновыми нитями, таким образом, играя ключевую роль в организации и динамика цитоскелета.

4.2.5 Список использованных источников

1. Weinberger R.P., Henke R.C., Tolhurst O., Jeffrey P.L., Gunning P., Induction of neuron-specific tropomyosin mRNAs by nerve growth factor is dependent on morphological differentiation//*J. Cell Biol.* Vol. 120 (1993) 205–215.
2. Caldwell B.J., Lucas C., Kee A.J., Gaus K., Gunning P.W., Hardeman E.C., Yap A.S., Gomez G.A., Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens//*Cytoskeleton.* Vol. 71 (2014) 663–676.
3. McMichael B.K., Lee B.S., Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive capacity in osteoclasts//*Exp, Cell Res.* Vol. 314 (2008) 564–573.
4. Geeves M.A., Hitchcock-DeGregori S.E., Gunning P.W., A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms//*J. Muscle Res. Cell Motil.* Vol. 36 (2015) 147–153, <https://doi.org/10.1007/s10974-014-9389-6>.
5. Marchenko M., Nefedova V., Artemova N., **Kleymenov S.**, Levitsky D., Matyushenko A. Structural and functional peculiarities of cytoplasmic tropomyosin isoforms, the products of tpm1 and tpm4 genes//*International Journal of Molecular Sciences.* 2021. Vol. 22. Is. 10. Art. no. 5141. **DOI:** 10.3390/ijms22105141.
6. Lawlor M.W., Dechene E.T., Roumm E., et al., Mutations of tropomyosin 3 (TPM3) are common and associated with type 1 myofiber hypotrophy incongenital fiber type disproportion//*Hum. Mutat.* Vol. 31 (2010) 176e183.
7. Schevzov G., Curthoys N.M., Gunning P.W., Fath T., Functional diversity of actin cytoskeleton in neurons and its regulation by tropomyosin//*Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298 (2012) 33–94, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00002-X>.
8. Curthoys N.M., Gunning P.W., Fath T., Tropomyosins in neuronal morphogenesis and development//in: R.A. Nixon, A. Yuan (Eds.), *Cytoskeleton of the Nervous System*, Springer, New York, NY, USA, 2011, pp. 411–445.

9. Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Simonyan A.O., Avrova S.V., et al., The primary causes of muscle dysfunction associated with the point mutations in Tpm3.12; conformational analysis of mutant proteins as a tool for classification of myopathies//Int. J. Mol. Sci. Vol. 19 (2018) 3975, <https://doi.org/10.3390/ijms19123975>.
10. Spudich J.A., Watt S., The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin// J. Biol. Chem. Vol. 246 (1971) 4866–4871.
11. Matyushenko A.M., S.Y. Kleymenov, Susorov D.S., Levitsky D.I., Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle iso-forms of tropomyosin// Biophys. Chem. Vol. 243 (2018) 1-7.
12. Pardee J.D., Spudich J.A., Purification of muscle actin//Methods Enzymol. Vol. 85 PtB (1982) 164-179.
13. Margossian S.S., Lowey S., Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle//Methods Enzymol. Vol. 85 (Pt B) (1982) 55-71.
14. Marchenko M.A., Nefedova V. V., Yampolskaya D. S., Borzova V. A., Kleymenov S. Y., Nabiev S. R., Nikitina L. V., Matyushenko A. M., Levitsky D. I., Comparative structural and functional studies of low molecular weight tropomyosin isoforms, the TPM3 gene products//Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 710 (2021) 108999 <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108999>
15. Gonchar A. D., Kopylova G. V., Kochurova A. M., Berg V. Y., Shchepkin D. V., Koubasova N. A., Tsaturyan A. K., Kleymenov S. Y., Matyushenko A. M, Levitsky D. I., Effects of myopathy-causing mutations R91P and R245G in the TPM3 gene on structural and functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 534 (2021) 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.103>
16. Moraczewska J., Nicholson-Flynn K., Hitchcock-DeGregori S.E., The ends of tropomyosin are major determinants of actin affinity and myosin subfragment 1-induced binding to F-actin in the open state, Biochemistry Vol. 38 (1999) Pp. 15885–15892, <https://doi.org/10.1021/bi991816j>.
17. Janco M., Bonello T.T., Byun A., Coster A.C.F., Lebar H., Dedova I., Gunning P.W., Böcking T., The impact of tropomyosins on actin filament assembly is isoform specific, BioArchitecture Vol. 6 (2016) 61–75, <https://doi.org/10.1080/19490992.2016.1201619>.

Подраздел 4.3 Динамика энергетического метаболизма и роста в онтогенезе животных

4.3.1 Введение

Рост животных, как и многие другие биологические процессы, происходящие в онтогенезе, сопровождается биоритмами, некоторые из которых (экзогенные) вызваны циклическими процессами в окружающей среде, в то время как другие (эндогенные) не зависят от внешних ритмов. Наличие эндогенных биоритмов согласуется с представлением термодинамики нелинейных процессов об организме как неравновесной диссипативной структуре [1, 2]. Вдали от равновесного состояния в таких структурах возникают характерные ритмы диссипации энергии, связанные с определённым стационарным состоянием [2, 3].

Рост животных в онтогенезе тесно связан с интенсивной диссипацией энергии и также имеет циклический характер. В онтогенезе двустворчатых и брюхоногих моллюсков было обнаружено от одного до трех биоритмов удельной скорости роста, в зависимости от характерного времени процесса [5, 6, 9]. На интервалах времени, сопоставимых с продолжительностью жизни особей можно определить минимум два биоритма темпа роста, один из которых определяется текущим стационарным состоянием живой системы (гомеостазом), а другой - окончательным стационарным состоянием, к которому организм стремится на протяжении всей своей жизни (гомеорез) [5].

Надёжная идентификация биоритмов роста осложняется необходимостью продолжительных измерений на большом отрезке онтогенеза и с достаточной частотой, минимум втрое превышающей частоту исследуемого биоритма.

Однако, анатомические особенности некоторых видов, имеющих так называемые регистрирующие структура, например в виде колец прироста на раковине, позволяет провести ретроспективный анализ ритмов роста. Одним из таких видов является пресноводная жемчужница - мидия *Margaritifera margaritifera*. Представители этого вида часто живут более 100 лет, а наличие годовых колец прироста на поверхности раковины позволяет изучать закономерности и особенности их роста и связанные с ними биоритмы в природных популяциях [5, 6, 7, 8, 11].

Целью данной работы является определение параметров индивидуального линейного роста и связанных с ростом биоритмов в популяциях *M. margaritifera* рек Немина и Каменная (Карелия) и сравнение ритмических показателей роста в разных популяциях жемчужницы северо-западного региона России.

4.3.2 Материалы и методы

Исследовали раковины мертвых пресноводных двустворчатых моллюсков *M. margaritifera* L выброшенных в результате весеннего половодья на берег реки Немина бассейна Онежского озера и собранных на берегах и отмелях реки Каменная притока реки Кемь. Было собрано и изучено 23 раковины моллюсков обитавших в реке Немина [12] и 21 раковина моллюсков из реки Каменная [13].

Индивидуальный линейный рост моллюсков изучали путем измерения последовательных годовых колец на поверхности раковины. Для описания роста моллюсков в большинстве случаев используют уравнение Бергаланфи:

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

где t - номер измеренного годового кольца, начиная от макушки раковины; t_0 - возраст моллюска для годового кольца $t = 0$; L_t - длина годового кольца в возрасте $t + t_0$; L_{∞} - предельное значение длины раковины; c - константа роста. Использование коэффициентов уравнения Бергаланфи позволяет проводить сравнительные внутривидовые, межвидовые и межпопуляционные исследования роста животных.

Перед измерением верхний слой конхиолина удаляли с раковины кипячением в 1 М КОН в течение 10 мин. В результате такой обработки становятся отчетливо видны годовые кольца роста, образованные призматическим средним слоем (рисунок 4.3.1). Изображения были получены путем сканирования раковин сканером HP ScanJet 5400c (Китай). Длину каждого неповрежденного годового кольца измеряли с помощью программы Excel с точностью до 0,1 мм.



Рисунок 4.3.1 - Измерение годовых колец раковины пресноводной жемчужницы

Использовалось единое уравнение роста, частным случаем которого является уравнение Бергаланфи [4]:

$$dL_t/L_t dt = V_0 (1 - a)^t, \quad (2)$$

где L_t - длина годового кольца в возрасте t , V_0 - начальная скорость роста, a - коэффициент задержки роста.

Данные были аппроксимированы рекуррентной формой уравнения (1):

$$\Delta L = -aL_t + d, \quad d = -V_0/\ln(1 - a) + L_0, \quad (3),$$

где ΔL - прирост длины раковины в год, следующий за возрастом t , а L_0 - размер раковины в возрасте $t = 0$. Коэффициенты уравнения (2) сравнивали с помощью регрессионного анализа. Целесообразность использования этого уравнения оценивалась по критерию нелинейности [4]. Возраст моллюска (T) рассчитывали путем суммирования возраста первого измеренного годового кольца (T_1) и количества годовых колец, выделенных на поверхности раковины. Возраст первого измеренного годового кольца был рассчитан по аналитической форме уравнения (3):

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

где L_1 - длина первого измеренного годового кольца. Необходимость такого метода определения возраста продиктована тем, что почти у всех моллюсков раковина корродирована, а часть годовых 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).

Основной тренд и биоритмы определялись методом сингулярного спектрального разложения с использованием программного обеспечения Caterpillar (версия 3.40, разработка GistaT Group, Россия), вариант «без центрирования». Параметр «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 (P) определяли путем расчета среднего значения удвоенных временных интервалов между последовательными локальными экстремумами. Амплитуду биоритмов (A) рассчитывали, как половину разницы между значениями последовательных локальных экстремумов. Зависимость амплитуды колебаний

от возраста для угасающих биоритмов аппроксимировалась степенным уравнением (4)

$$A = bT^c,$$

где A - амплитуда; T - возраст достижения экстремума, b и c - коэффициенты.

Аппроксимации уравнениями (1) - (4) 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 χ^2 . Во всех случаях, когда рассчитывались средние значения, также вычислялась стандартная ошибка среднего.

Величину среднегодовой температуры воздуха места обитания моллюсков получали на сайте CLIMATE-DATA.ORG. 2019. <https://ru.climate-data.org/>.

4.3.3 Результаты и обсуждение

Возрастные изменения интенсивности линейного роста *M. Margaritifera* из популяции реки Немина хорошо описывает уравнение (3) [13]. Коэффициент замедления роста a в уравнении (3) варьирует внутри изученной выборки в пределах от 0.032 до 0.077 лет⁻¹, но различия между индивидуумами не достоверны. Вариационный ряд, составленный из значений коэффициентов a уравнения (3) имеет нормальное распределение по критерию χ^2 .

Таким образом для характеристики популяции жемчужницы реки Немина можно с большой степенью достоверности использовать среднее значение $a = 0.062 \pm 0.003$ лет⁻¹

Спектральный анализ методом сингулярного разложения показал практически полное соответствие формы основного тренда аппроксимационной кривой на основе уравнения роста (2).

Линейный рост *M. Margaritifera*, обитающих в рее Каменная, был исследован впервые [12]. В некоторых случаях моллюски в выборке были недостаточно старыми для определения периода низкочастотных колебаний удельной скорости роста.

Периоды каждого из биоритмов не показали существенных изменений ни в онтогенезе отдельных особей, ни среди особей. Поэтому размер выборки при определении периода низкочастотного биоритма оказался немного меньше остальных.

Средние по выборке периоды колебаний удельной скорости роста составили 11.5 ± 0.7 лет для низкочастотных биоритмов ($n=15$), 6.4 ± 0.2 года для ритма средней частоты ($n = 19$) и 4.0 ± 0.1 года для высокочастотного биоритма ($n = 20$).

В предыдущих исследованиях популяций моллюсков рек Кереть, Сюскюяййоки и Ливойоки (Карелия) не удалось идентифицировать низкочастотный ритм роста [5, 8, 11]. Причина этого могла быть, во-первых, в том, что у некоторых экземпляров количество видимых годовых колец прироста было слишком мало для описания периода ритма, во-вторых, в том, что при использовании программы Caterpillar для выявления ритмов была принята слишком маленькая длина окна. Увеличив длину окна до указанных выше значений позволяет определить биоритм средней и низкой частоты [6].

Во всех указанных популяциях это затухающие ритмы, уменьшение амплитуды которых может быть описано степенным уравнением (4). В таблице 4.3.2 приведены параметры роста в популяциях *M. margaritifera* рек Карелии и мурманской области. Можно видеть, что коэффициент замедления роста и период биоритма средней частоты (P2) уменьшаются с увеличением среднегодовой температуры воздуха места обитания с соответствующими корреляциями значимо отличными от нуля: $\eta(a/t) = 0.98 \pm 0.11$, $p < 0.01$; $\eta(P2/t) = 0.92 \pm 0.23$, $p < 0.05$. В то же время средние величины периодов биоритмов низкой (P1) и высокой (P2) частоты остаются неизменными во всех популяциях жемчужницы.

Таблица 4.3.2 - Параметры роста и среды обитания различных популяций *Margaritifera margaritifera*

Река (широта, температура)	$T, ^\circ\text{C}$	$a, \text{лет}^{-1}$	$P1, \text{лет}$	$P2, \text{лет}$	$P3, \text{лет}$
Сюскюяййоки (61.7° N)	4.9	0.114 ± 0.003 ($n = 88$)	13.8 ± 0.7 ($n = 44$)	6.0 ± 0.1 ($n = 81$)	4.0 ± 0.1 ($n = 88$)
Немина (62.8° N)	2.3	0.062 ± 0.003 ($n = 23$)	12.6 ± 0.8 ($n = 21$)	6.4 ± 0.2 ($n = 23$)	4.0 ± 0.1 ($n = 23$)
Каменная (64.4° N)	0.7	0.076 ± 0.003 ($n = 21$)	11.5 ± 0.7 ($n = 15$)	6.4 ± 0.2 ($n = 19$)	4.0 ± 0.1 ($n = 20$)
Ливойоки	0.7	0.060 ± 0.006	13.8 ± 1.2	6.2 ± 0.2	4.0 ± 0.1

(64.8° N)		(n = 32)	(n = 21)	(n = 28)	(n = 29)
Кереть	0.1	0.061 ± 0.002	13.8 ± 1.5	6.8 ± 0.4	4.0 ± 0.1
(66.0° N)		(n = 11)	(n = 8)	(n = 11)	(n = 11)
Варзуга	0.8	0.048 ± 0.001	13.4 ± 0.1	6.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1
(66.7° N)		(n = 90)	(n = 50)	(n = 84)	(n = 90)

t - среднегодовая температура воздуха; a — коэффициент замедления роста в уравнении (2); n — количество экземпляров; $P1$, $P2$, $P3$ - периоды низко-, средне- и высокочастотных биоритмов соответственно.

4.3.4 Заключение

Сравнение биоритмов линейного роста *M. Margaritifera* живущих при разной среднегодовой температуре позволяет предположить, что ритм средней частоты (период около 6 недель) отражает влияние температуры обитания на онтогенез в целом. Непрерывное снижение амплитуды низкочастотного и среднечастотного ритмов удельного линейного роста указывает на то, что связанные с ним морфо-физиологические процессы не достигают стационарного состояния за весь период онтогенеза, то есть являются порождением глобального онтогенетического процесса. Заметные различия периодов ритма средней частоты в популяциях, обитающих при разной температуре, позволяют предположить изменение термодинамической траектории приближения организма к конечному стационарному состоянию и выделить ритм роста средней частоты как показатель модификации онтогенеза.

4.3.5 Список цитированной литературы

1. Nicolis G. Fluctuations around non-equilibrium states in open non-linear systems//J. Stat. Phys. 1972. Vol. 6. Nos. 2/3. P. 195–222.
2. Nicolis G., Prigogine I. Self-Organization in Nonequilibrium Systems: From Dissipative Structures to Order through Fluctuations. - New York: Wiley Intersci., 1977.
3. Prigogine I., Nicolis G. Biological order, structure and instabilities//Quart. Rev. Biophys. 1971. Vol. 4. nos. 2/3. P. 107–148.
4. Zotin A.A. Statistical estimation of allometric coefficients//Biol. Bull. (Moscow). 2000. Vol. 27. No. 5. P. 431–437.

5. Zotin A.A. Patterns of growth and energy metabolism in the ontogeny of mollusks//Extended Abstract of Doctoral (Biol.) Dissertation. Moscow: Inst. Dev. Biol., Russ. Acad. Sci., 2009.
6. Zotin A.A. Growth biorhythms of the European pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae) of the Varzuga River population (Murmansk oblast)//Biol. Bull. (Moscow). 2020. Vol. 47. No. 4. P. 381–388.
7. Zotin A.A., Ieshko E.P. Comparative analysis of the growth of *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia) from different populations of Karelia and Kola Peninsula//Biol. Bull. (Moscow). 2017. Vol. 44. No. 1. P. 1–5.
8. 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. Vol. 49. No. 4. P. 206–213.
9. Zotin A.A., Kleimenov S.Yu. Endogenous biorhythms of the specific growth rate in individual development of *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda)//Biol. Bull. (Moscow). 2013. vol. 40, no. 1, P. 1–10.
10. Zotin, A.A. and Zotin, A.I., Thermodynamic bases of developmental processes, J. Non-Equilib. Thermodyn., 1996, Vol. 21, no. 4, P. 307–320.
11. Zotin, A.A., Murzina, S.A., and Ieshko, E.P., Growth biorhythms in the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae). Livojoki River population (Karelia), Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst. 2018. Vol. 419. P. 44–51.
12. Zotin A.A., Murzina S.A., Efremov D.A., Oulasvirta P., Ieshko E.P. Ecology of *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae) in the river Kamennaya, White Sea basin, Russia//Nature Conservation Research. Заповедная наука. 2021(a). Vol. 6. Sup. 1. DOI: 10.24189/ncr.2021.005.
13. Zotin A.A., Ieshko E.P. Growth Biorhythms of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae), Nemina River Population (Karelia)//Biology Bulletin. 2021(b). Vol. 48. Is. 3. P. 306-312. DOI: 10.1134/S1062359021030195.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование в рамках данной научной темы посвящено одной из важнейших задач современной биологии 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 до позвоночных животных.

Нормальное развитие, строение и функционирование репродуктивной системы имеет огромное значение для стабильного хода процессов гаметогенеза. В ходе нашей работы было впервые получены данные о тесной взаимосвязи между дифференцировкой разных клеточных популяций в мужской гонаде. Также было показано существование факторов, продуцируемых семенными канальцами и воздействующих на сертоли-подобные клетки (СПК). СПК в постнатальном развитии дифференцируются: выходят из клеточного цикла и снижают экспрессию генов, общих с клетками Сертоли. Показано, что этот процесс контролируется трийодтиронином и фолликулостимулирующим гормоном опосредованно, через другие клетки семенника, причем трийодтиронин играет решающую роль в этом процессе. Полученные результаты могут быть использованы для поиска методов коррекции нарушений сперматогенеза и терапии мужского бесплодия.

В экспериментах на культуре изолированных овариальных фолликулов выявлены эффекты серотонина на экспрессию нескольких генов-показателей функциональной активности клеток гранулезы (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Igfbp* и *lhh*), а также важнейшего ооцитарного фактора роста *Gdf9*. Выявлено, что большая часть наблюдаемых эффектов отменяется флуоксетином, следовательно, опосредована активностью специфического транспортера серотонина SERT (но не неспецифических ОСТ/PMAT-опосредованных механизмов транспорта). Полученный результат является важным свидетельством того, что овариальный серотонин воздействует на функциональную активность клеток гранулезы опосредованно через влияние на ооцит, и требует дальнейшего более внимательного исследования.

Эволюция клеточных и молекулярных механизмов регуляции развития животных изучалась на моделях эмбриогенеза морского гидроида *Dynamena pumila* и развития агрегатов диссоциированных клеток губки *Halisarca dujardini*. Мы получили новые данные о молекулярных и клеточных механизмах формирования плана строения у базальных Metazoa, сопоставили их с данными, имеющимися для Bilateria. Полученные данные подтвердили

эволюционно первичную роль каскадов cWnt и TGF-beta в спецификации оси тела Metazoa. Вместе с тем, впервые удалось показать, что гастрюляционные морфогенезы и спецификация зародышевых листков у базальных Metazoa могут быть разобщены с молекулярной разметкой плана строения. Причем это разобщение не влияет на высокую устойчивость процесса формирования основной оси тела.

На основании собственных и литературных данных был проведен анализ особенностей взрослых стволовых клеток (ВСК), играющих ключевую роль в регенерации, у губок и других беспозвоночных животных. Предложена модель, согласно которой ВСК с любым статусом стволовости могут возвращаться к тотипотентности, даже из полностью дифференцированного состояния. Сделан вывод, что ВСК позвоночных представляют собой только один, и не самый типичный, подтип ВСК Metazoa.

Изучение морфомеханики гастрюляции амфибии *Xenopus laevis* позволило показать роль пространственной неоднородности движений клеток в деформацию тканей супрабластопоральной области гастрюлы (СБО). Анализ формы клеток СБО позволил показать, что интеркаляционные перегруппировки клеток компенсируют растяжение материала СБО в ходе инволюции материала осевых структур эмбриона.

Влияние географических (температурных) условий на физиологические параметры развивающегося организма изучалось на головастиках остромордой лягушки из популяций Брянской и Московской областей. При выращивании в контролируемых лабораторных условиях, темп развития, скорость потребления кислорода на особь и на грамм веса, а также скорость прироста массы тела оказались достоверно выше у особей из более северной популяции с коротким сезоном активности. Сохранение этого соотношения при развитии головастиков при одинаковой температуре указывает на то, что особенности их физиологии, задающие разный темп развития, закреплены генетически.

Влияние гипоксии на развитие эмбриона позвоночных изучалось на эмбрионах птицы (курицы). Был проведен метаанализ изменения реакции сердечного ритма эмбриона на острую гипоксию. Было обнаружено 4 периода в изменении гипоксического ответа ЧСС в пренатальный период: 2-7 сут, 8-11 сут, 12-18 сут и 19-21 сут инкубации. Предположительно, изменения характеристик ответа ЧСС на острую гипоксию во время и между этими периодами связаны с развитием сердечно-сосудистой и дыхательной системы эмбриона, а также с формированием нейрогормонального контроля работы сердца.

Биоритмы ростовых процессов и энергетического обмена были исследованы в онтогенезе пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera L* из разных популяций северо-

запада России экспериментальными и математическими методами. Сравнение биоритмов линейного роста *M. margaritifera* живущих при разной среднегодовой температуре позволяет предположить, что ритм средней частоты (период около 6 недель) отражает влияние температуры обитания на онтогенез в целом.

Структурная стабильность молекул цитоскелета - важнейший механизм, обеспечивающий устойчивость процессов развития. Было показано, что мутации R91P и R245G в димере тропомиозина $\gamma\gamma$ -Tpm меняют характеристики взаимодействия F-актина с медленным миозином и их кальциевую регуляцию в присутствии медленного мышечного тропонина. Изменения функциональных свойств $\gamma\gamma$ -Tpm и значительные структурные изменения молекулы $\gamma\gamma$ -Tpm, вызванные этими мутациями, объясняют молекулярный механизм наследственного заболевания медленных скелетных мышц.

В 2021 году по данной теме опубликовано 15 отчетных публикаций в рамках выполнения Государственного задания.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2021 ГОД

1. **Кулибин А.Ю., Малолина Е.А.** Развитие сети семенника и ее роль в функционировании мужской гонады // Онтогенез. 2021. Т. 52. №. 6. С. 419-428. DOI: 10.31857/S0475145021060070. – R. – Kulibin A. Yu., Malolina E. A. The Rete Testis: Development and Role in Testis Function//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. No. 6. P. 375–383. DOI: 10.1134/S1062360421060072. – Q4.

2. **Sharov K.S.** The politics of reproduction: Adoption, abortion, and surrogacy in the age of neoliberalism//Journal of Family Theory and Review. -2021. -Vol. 13. -P. 239-244. - DOI: 10.1111/jftr.12415. – Q1.

3. **Шмуклер Ю.Б.¹, Алешина Н.М.¹, Мальченко Л.А.¹, Никишин Д.А.¹** Серотониновая система в оогенезе млекопитающих//Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2021. Т. 71. № 3. С. 306-320. DOI: 10.31857/S0044467721030084. – R – **Shmukler Y.B.¹, Alyoshina N.M.¹, Malchenko L.A.¹, Nikishin D.A.¹** Serotonin System in Oogenesis of Mammals//Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I P Pavlova. 2021. Vol. 71. Is. 3. P. 306-320. DOI: 10.31857/S0044467721030084. – Q4.

4. **Никишин Д.А.¹, Храмова Ю.В., Алешина Н.М.¹, Мальченко Л.А.¹, Шмуклер Ю.Б.¹** Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулы//Онтогенез. 2021. Т. 52. № 2. С. 120–128. DOI: 10.31857/S0475145021020063. – R. – **Nikishin D.A.¹, Khramova Y.V., Alyoshina N.M.¹, Malchenko L.A.¹, Shmukler Y.B.¹** Oocyte-Mediated Effect of Serotonin on the Functional Status of Granulosa Cells//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. P. 97–104. DOI: 10.1134/S1062360421020065. – Q4

5. **Vetrova A.A., Lebedeva T.S., Saidova A.A., Kupaeva D.M., Kraus Y.A., Kremnyov S.V.** From apolar gastrula to polarized larva: embryonic development of a marine hydroid, *Dynamena pumila*//Developmental Dynamics. 2021. DOI: 10.1002/dvdy.439. - Q1

6. Borisenko I., Bolshakov F.V., **Ereskovsky A.³**, Lavrov A.I. Expression of wnt and tgf-beta pathway components during whole-body regeneration from cell aggregates in demosponge *halisarca dujardinii*//Genes. 2021. Vol. 12. Is. 6. Art. no. 944. DOI 10.3390/genes12060944. – Q2

7. **Ereskovsky A.³**, Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I. Whole-body regeneration in sponges: Diversity, fine mechanisms, and future prospects//Genes. 2021. Vol. 12. Is. 4. Art. No 506. DOI: 10.3390/genes12040506. – Q2.

8. Rinkevich B., Ballarin L., Martinez P., Somorjai I., Ben-Hamo O., Borisenko I., Berezikov E., **Ereskovsky A.³**, Gazave E., Khnykin D., Manni L., Petukhova O., Rosner A., Rottinger E., Spagnuolo A., Sugni M., Tiozzo S., Hobmayer B. A pan-metazoan concept for adult

stem cells: the wobbling Penrose landscape // *Biological Reviews*. 2021. DOI: 10.1111/brv.12801. – Q1

9. **Bredov D.V.2**, Volodyaev I.V., Luchinskaya N.N. Spatio-Temporal Dynamics of Embryonic Tissue Deformations during Gastrulation in *Xenopus laevis*: Morphometric Analysis // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. Vol. 52. № 5. P. 277–286. DOI: 10.1134/S1062360421050027. – Q4.

10. **Zotin A.A.1**, Murzina S.A., Efremov D.A., Oulasvirta P., Ieshko E.P. Ecology of *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae) in the river Kamennaya, White Sea basin, Russia//*Nature Conservation Research. Заповедная наука*. 2021. Vol. 6. Sup. 1. DOI: 10.24189/ncr.2021.005. – Q.

11. **Зотин А.А.1**, Иешко Е.П. Биоритмы роста пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae) популяция р. Немина (Карелия)//*Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2021. № 3. С. 256-262. DOI: 10.31857/S000233292103019X. – R. - Zotin A.A.1, Ieshko E.P. Growth Biorhythms of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia, Margaritiferidae), Nemina River Population (Karelia)//*Biology Bulletin*. 2021. Vol. 48. Is. 3. P. 306-312. DOI: 10.1134/S1062359021030195. – Q4

12. Ляпков С.М., **Клеймёнов С.Ю.** Межпопуляционные различия в темпе развития и потреблении кислорода головастиками остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia) // *Онтогенез*. 2021. Т. 52. № 2. С. 151-154. DOI: 10.31857/S0475145021020038. – R. – Lyapkov S.M., **Kleymenov S.Y1**. Interpopulational Differences in the Developmental Rate and Oxygen Consumption in Tadpoles of Moor Frog (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia)//*Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. Vol. 52. P. 125–128. DOI: 10.1134/S106236042102003X. – Q4.

13. Marchenko M., Nefedova V., Artemova N., **Kleymenov S.1**, Levitsky D., Matyushenko A. Structural and functional peculiarities of cytoplasmic tropomyosin isoforms, the products of tpm1 and tpm4 genes//*International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Is. 10. Art. no. 5141. DOI: 10.3390/ijms22105141. – Q1.

14. Marchenko M.A., Nefedova V.V., Yampolskaya D.S., Borzova V.A., **Kleymenov S.Y.1**, Nabiev S.R., Nikitina L.V., Matyushenko A.M., Levitsky D.I. Comparative structural and functional studies of low molecular weight tropomyosin isoforms, the TPM3 gene products//*Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021. Vol. 710. Art. no 108999. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108999. – Q1

15. Gonchar A.D., Kopylova G.V., Kochurova A.M., Berg V.Y., Shchepkin D.V., Koubasova N.A., Tsaturyan A.K., **Kleymentov S.Y.**, Matyushenko A.M, Levitsky D.I. Effects of myopathy-causing mutations R91P and R245G in the TPM3 gene on structural and functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin//Biochemical and Biophysical Research Communications. 2021. Vol. 534. P. 8-13. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.103. – Q2.

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