СОДЕРЖАНИЕ

Том 51, номер 1, 2020

ОБЗОРЫ

Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков)
Н. Н. Круглова, Г. Е. Титова, О. А. Сельдимирова, А. Е. Зинатуллина, Д. С. Веселов 3

Роль редокс-системы в инициации регенерационного ответа нейральных тканей глаза позвоночных
Ю. В. Маркитантова, В. Н. Симирский 19

Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека
Ю. П. Новикова, В. А. Поплинская, Э. Н. Григорян 35

Развитие и старение репродуктивной системы млекопитающих
С. Я. Амстиславский, Е. Ю. Брусенцев, О. М. Петрова, В. А. Напримеров, А. Л. Левинсон 51

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Дофамин-продуцирующие нейроны в онтогенезе у крыс: фенотипические особенности, характеризующие молекулярные механизмы секреции и регуляции
А. И. Куртова, Л. К. Дильмухаметова, Т. С. Пронина, Э. Р. Мингазов, Ю. О. Никишина, К. К. Сухинич, М. В. Угрюмов 64

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Зависимость отношения длин второго и четвертого пальцев (2D:4D) от условий пренатального развития у водяной полевки (*Arvicola amphibius* L.)
Г. Г. Назарова, Л. П. Проскурняк, Е. И. Южик 73

Contents

Vol. 51, No. 1, 2020

REVIEWS

Embryo of Flowering Plants at the Critical Stage of Relative Autonomy of Embryogenesis (on the Example of Cereals)
N. N. Kruglova, G. E. Titova, O. A. Seldimirova, A. E. Zinatullina, and D. S. Veselov 3

The Role of the Redox System in Initiation of Neural Eye Tissues Regenerative Response in Vertebrates
Yu. V. Markitantova and V. N. Simirskii 19

Organotypic Culturing as a Way of Studying of Recovery Opportunities of the Retina of Vertebrate Animals and Human
Yu. P. Novikova, V. A. Poplinskaya, and E. N. Grigoryan 35

Development and Ageing of the Mammalian Reproductive System
S. Ya. Amstislavsky, E. Yu. Brusentsev, O. M. Petrova, V. A. Naprimerov, and A. L. Levinson 51

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF MAMMALS

Dopamine-Producing Neurons in Ontogeny in Rats: Phenotypic Features that Characterize the Molecular Mechanisms of Secretion and Regulation
A. I. Kurtova, L. K. Dil'mukhametova, T. S. Pronina, E. P. Mingazov, Y. O. Nikishina, K. K. Sukhinich, and M. V. Ugrumov 64

MECHANISMS OF NORMAL AND PATHOLOGICAL TISSUE DEVELOPMENT

Dependence of the Ratio of the Lengths of the Second and Fourth Fingers (2D:4D) on the Conditions of Prenatal Development in a Water Vole (*Arvicola amphibius* L.)
G. G. Nazarova, L. P. Proskurnyak, and E. I. Yuzhik 73

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 3–18

ОБЗОРЫ

УДК 58.085:581.143.6:581.3

ЗАРОДЫШ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ В КРИТИЧЕСКУЮ СТАДИЮ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АВТОНОМНОСТИ ЭМБРИОГЕНЕЗА (НА ПРИМЕРЕ ЗЛАКОВ)

© 2020 г. Н. Н. Круглова[a, *], Г. Е. Титова[b, c], О. А. Сельдимирова[a], А. Е. Зинатуллина[a], Д. С. Веселов[a]

[a]Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

[b]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия

[c]Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 05.07.2019 г.
После доработки 25.09.2019 г.
Принята к публикации 30.09.2019 г.

Автономность – особое структурно-функциональное состояние зародыша, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма (полная автономность). Особый интерес вызывает относительная автономность как одна из критических стадий эмбриогенеза, когда незрелый зародыш становится независимым от ряда физиологических факторов материнского организма, в частности, гормонов (главным образом, ауксинов, цитокининов, АБК). В статье на примере культурных злаков и в сравнении с представителями других семейств цветковых растений приведен обзор литературных и собственных данных по выявлению как критической стадии относительной автономности зародыша в эмбриокультуре *in vitro*, так и морфологического, гистологического и физиологического статуса относительно автономных зародышей. Обсуждаются перспективы исследования проблемы относительной автономности эмбриогенеза растений, а также использования автономных зародышей в биотехнологических исследованиях.

Ключевые слова: зародыш, эмбриогенез, автономность зародыша (полная, относительная), культурные злаки

DOI: 10.31857/S0475145020010024

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными эмбриологическими исследованиями различных видов растений установлено, что развитие зародыша (эмбриогенез) представляет собой единый процесс, в результате которого из исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения (обзоры и монографии: Поддубная-Арнольди, 1976; Raghavan, 1976, 1997; Банникова, Хведынич, 1982; Goldberg et al., 1994; Meinke, 1995; Plant Embryogenesis, 1995; Терёхин, 1996; Эмбриология цветковых.., 1997, 2000; Reynolds, 1997; Батыгина, Васильева, 2002; Methods in Molecular Biology.., 2008; Harada et al., 2010; Батыгина, 2014). Зародыш развивается согласно определенным паттернам клеточных делений, а выявленные эмбриогенетические законы (закон происхождения, закон чисел, закон расположения, закон экономии, по: Шамров, 1997) отражают сложность этого процесса.

В то же время, в своем морфогенезе зародыш проходит ряд взаимосвязанных стадий (или, в терминологии различных авторов, – периодов, фаз, этапов), различающихся как по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, так и значению для дальнейшего развития. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию морфогенетического потенциала зародыша и онтогенетической программы развития особи в целом, а зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов (Batygina, 2002, 2012; Батыгина, 2014).

Стадийность эмбриогенеза тесно связана с разработкой проблемы критических периодов (этапов, фаз, стадий) в онтогенезе растений. Понятие “критический период развития” широко используется в различных областях биологии развития

растений, главным образом, сельскохозяйственных культур (Светлов, 1960; Сказкин, 1971; Батыгин, 1986, 1995, 2007; Лыкова, 2009; Терлецкая, 2012 и др.), при этом предлагаются различные критерии выделения таких периодов. В частности, хорошо известен критерий выделения критических периодов в развитии растений, основанный на их повышенной чувствительности к воздействию внешних факторов, впервые сформулированный П.И. Броуновым (1897, цит. по: Светлов, 1960).

В литературе представлены различные мнения о критериях выделения критических периодов (фаз, стадий) эмбриогенеза растений. Так, В.П. Банникова с соавт. (Основы эмбриогенеза..., 1991) считают критическими те фазы эмбриогенеза злаков, которые характеризуются повышенной чувствительностью зародышей к экстремальным условиям, вплоть до блокирования их развития. Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой (1983) в основу выделения критических стадий эмбриогенеза растений положен системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций в развитии эмбриональных структур; при этом критическими стадиями авторы называют отрезки времени, характеризующиеся сменой структурно-функциональных характеристик в развитии зародыша и окружающих тканей семени и плода.

Идеи последних авторов получили развитие в цикле работ И.И. Шамрова с соавт. (Шамров, Никитичева, 1992; Шамров, Анисимова, 1993; Шамров, 1995, 1997; Shamrov, Anisimova, 2003; Шамров, 2008), посвященным периодизации развития семязачатка и семени цветковых растений. На основании морфогенетических и морфофизиологических корреляций критическими стадиями авторы называют относительно короткие отрезки времени, связанные со структурно-функциональными перестройками семязачатка и семени и названные по основной образующейся эмбриональной структуре, тогда как более продолжительные интервалы времени с относительно постоянным характером развития этих структур авторы относят к периодам (но не критическим). Как полагают эти исследователи, при определении критических стадий немаловажное значение имеет рассмотрение гистохимических аспектов: динамики накопления белков, углеводов, танинов в отдельных тканях. Сопоставление гистохимических реакций с морфологическими изменениями позволило оценить темпы дифференциации и функциональную активность разных типов тканей, уточнить последовательность развития семязачатка и семени. Исследователи предлагают выделять как общие стадии развития семязачатков, отражающие общие принципы организации этих структур и указывающие на пространственно-временную детерминацию их основных элементов, так и специфические стадии, указывающие на принадлежность семязачатка к определенному типу; при этом одни и те же специфические стадии развития семязачатков данного типа могут отличаться у разных таксонов, а виды с различными типами семязачатка могут иметь одни и те же специфические стадии (по: Шамров, 2008).

Как полагают F. Wareing и I. Phillips (1981), в критические стадии эмбриогенеза происходит переключение программы развития зародыша растений на альтернативные пути, а те или иные его части становятся “детерминированными” в отношении их дальнейшей дифференциации. Эта точка зрения во многом согласуется с понятием эмбриональной индукции у животных – взаимодействием эмбриональных закладок, ведущем к формообразовательному эффекту посредством ткани-мишени, которая становится детерминированной к определенному типу развития; затем детерминированное состояние ткани реализуется в процессе дифференциации (по: Корочкин, 2002). С этих позиций, автономность (независимость от материнского организма) может рассматриваться как одна из критических стадий эмбриогенеза растений, в ходе которой закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша как нового организма (по: Батыгина, 1987).

Проблема автономности зародыша и прогрессивной автономизации развития хорошо изучена И.И. Шмальгаузеном (1968) у позвоночных животных на значительном сравнительно-эмбриологическом и экспериментальном материале. Исследователь пришел к выводу, что “гомеостазис” (способность к саморегуляции, автономность) – одна из наиболее ярких характеристик живого, а автономизация онтогенеза – один из направленных процессов эволюции органического мира. Согласно автору, “... Развитие регуляторных систем и прогрессивная автономизация развития означают полную перестройку онтогенеза со всеми его факторами. Основное значение имеет при этом прогрессивное усложнение системы морфогенетических корреляций, создаваемых за счет элементарных выражений плейотропизма и постепенно приобретающих все более выраженный регуляторный характер. При этом достигается максимальная эволюционная пластичность организма, как за счет большого скрытого резерва изменчивости и связанной с нею мобильности, так и за счет индивидуальной приспособляемости и возможности быстрого фиксирования ее важнейших результатов. Это обеспечивает максимальные темпы эволюции высших животных с их большой индивидуальной приспособляемостью и автономным развитием, при высоко развитой системе регуляций.” (Шмальгаузен, 1968: с. 357).

Понятие “автономность зародыша” по отношению к растениям разработано в меньшей степени, хотя вопрос о самостоятельности зародыша и его независимости от материнского организма ставился в литературе, например, в связи с вопросами систематики и филогении цветковых растений (Тахтаджян, 1966), физиологической способности семян к автотрофному существованию и преждевременному прорастанию (Цингер, 1958; Raghavan, 1976; Батыгин, 1986, 1995; Терёхин, 1996; Обручева, Антипова, 1997; Николаева и др., 1999; Обручева, 2012, 2014).

Большой вклад в разработку проблемы автономности зародыша растений как биологического феномена внесли Т.Б. Батыгина и В.Е. Васильева (Батыгина, Васильева, 1983, 1987, 2002; Батыгина, 1987; Batygina, Vasilyeva, 1987, 1988; Васильева, Батыгина, 1997; Vasilyeva, Batygina, 2006). Эти авторы расценивают автономность как особое структурно-функциональное состояние развивающегося зародыша, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Автономность зародыша, развивающегося в семени в естественных условиях, рассматривается ими как важный критический этап автономизации онтогенеза растений, характеризующийся комплексом видоспецифичных морфофизиологических показателей; с этапа автономизации зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития. Соглашаясь с идеей И.И. Шмальгаузена о прогрессивной автономизации эмбриогенеза как направленного процесса эволюции живых систем, авторы предлагают различать полную и относительную автономность зародыша растений. Полная автономность достигается по завершении прорастания семени и образования проростка (т.е. нового организма), когда прекращаются все структурные и функциональные связи зародыша с материнским организмом (плодом, семенем). У различных видов растений эта связь прекращается в разное время, что обусловлено конкретным строением семени и плода. Относительную автономность зародыш приобретает, когда становится независимым от физиологических и биохимических факторов материнского организма. Учитывая, что становление автономности – сложный длительный процесс, авторы полагают, что следует ввести и понятие “степень автономности” как количественное и временное выражение зависимости зародыша от материнского организма.

Выделение понятия относительной автономности, на наш взгляд, методологически весьма перспективно в теоретическом и особенно практическом отношениях. Действительно, относительная автономность эмбриогенеза во многом обусловлена структурными особенностями зародыша, и тем самым выявление этой критической стадии может способствовать решению ряда проблем теоретической морфологии и эволюции высших растений. Особенно это касается злаков, зрелый зародыш которых выделяется среди зародышей покрытосеменных растений своими специфическими органами и Graminad-типом эмбриогенеза (Батыгина, 1968а, 1968б, 1974, 1987, 1997б; Поддубная-Арнольди, 1978, 1982; Сравнительная эмбриология..., 1990; Основы эмбриогенеза злаков, 1991; Батыгина, 1997а; Батыгина, Васильева, 2002; Круглова и др., 2019б).

В последние годы возрастает и практический интерес к эмбриогенезу злаков при разработке различных проблем эмбриокультуры *in vitro* (обзоры: Raghavan, 2003; Elhiti, Stasolla, 2011; Plant Embryo Culture..., 2011; Hussain et al., 2012) как способа биотехнологических исследований представителей этого семейства (Круглова, Катасонова, 2009; Игнатова, 2011; Круглова, Сельдимирова, 2011; Круглова, 2012а; Rostami et al., 2013; Slesak et al., 2013; Delporte et al., 2014; Zhang et al., 2015; Huang et al., 2016; Сельдимирова и др., 2017б и др.). На наш взгляд, данные об относительной автономности зародыша могут иметь определенное значение в оптимизации биотехнологических исследований злаков как коммерчески ценной группы растений. В этой связи важно выявить физиологическую готовность относительно автономных зародышей злаков к дальнейшему нормальному развитию и прорастанию, главным образом содержание и локализацию в них эндогенных фитогормонов.

Цель данной работы – на примере злаков, в сравнении с представителями других семейств цветковых растений, провести анализ литературных и собственных данных, посвященных как выявлению критической стадии относительной автономности, во время которой зародыши становится независимым от гормонов материнского организма, так и оценке морфологического, гистологического и физиологического статуса относительно автономных зародышей.

ВЫЯВЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ЗЛАКОВ

Критическая стадия относительной автономности зародыша у представителей разных таксонов цветковых растений различна, поскольку определяется сложившимися в ходе эволюции таксона морфогенетическими и морфофизиологическими корреляциями в развитии зародыша и окружающих тканей материнского организм. На уровне особи степень структурной и функциональной дифференциации относительно автономного зародыша обусловлена генотипом не только зародыша (тип эмбриогенеза, специфика

развития), но и генотипом материнского организма (условия внутри развивающегося семени, опосредованно связанного с материнским организмом в целом) (по: Васильева, Батыгина, 1997; Батыгина, Васильева, 2002).

Предложен экспериментальный способ выявления критической стадии относительной автономности зародыша, состоящий в использовании метода эмбриокультуры *in vitro*, – по способности разновозрастных изолированных зародышей завершить эмбриогенез и дать нормальный проросток на безгормональной питательной среде (Батыгина, Васильева, 1987). Такой подход вполне оправдан. Действительно, с одной стороны, именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации морфогенетических программ (в том числе потенциальных) развития зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми потенциями взрослого организма. С другой стороны, именно в культуре *in vitro* экспериментатор может моделировать условия материнского организма и выявить ту стадию эмбриогенеза *in vivo*, когда незрелый зародыш способен к дальнейшей дифференциации и прорастанию в нормальное растение при отсутствии экзогенных гормонов питательной среды. Предложено (Круглова, Катасонова, 2009) уточнение этого экспериментального способа: давать оценку стадии относительной автономности зародыша не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной питательной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного растения далее, в условиях *ex vitro*.

Для выявления относительной автономности необходимо знать, на какой стадии (фазе, периоде, этапе) эмбриогенеза находится инокулируемый незрелый зародыш. Ситуация со злаками усложнена тем, что для представителей этого семейства не разработана единая периодизация эмбриогенеза. Причина этого, на наш взгляд, состоит в особенностях как процесса эмбриогенеза, так и строения зрелого зародыша злаков. Своеобразный дорсовентральный способ развития начиная с зиготы, специфика органогенеза и уникальное строение высокодифференцированных органов зрелого зародыша (щиток, колеоптиль, эпибласт, колеориза, мезокотиль, эпикотиль с плюмулой, лигула) дали основание выделить особый тип эмбриогенеза – Graminad (Батыгина, 1968а, 1974, 1987, 1997б). Правомочность выделения Graminad-типа эмбриогенеза подтверждается исследованиями эмбриогенеза различных видов злаков (обзор: Круглова и др., 2019б).

Предложено несколько периодизаций развития зародыша злаков. Наибольшей теоретической обоснованностью отличается периодизация, разработанная Т.Б. Батыгиной (1987, 1997а). Исследователь выделяет в развитии зародыша злаков две фазы – бластомеризацию, или фазу первичной дифференциации зародыша (начинается с формирования зиготы, продолжается образованием многоклеточного зародыша, заканчивается обособлением эмбриодермы) и органогенез (начинается с дифференциации гистогенов в многоклеточном зародыше, продолжается обособлением зачатков органов и заканчивается тканевой дифференциацией органов). Во всех сложных преобразованиях, происходящих в ходе эмбриогенеза, определяющую роль, по мнению автора, играют последовательные изменения ритма митотической активности и ориентация клеточных делений в разных областях (кластерах) зародыша, что и обусловливает как дорсовентральность строения, так и формирование специфических органов зрелого зародыша злаков.

В работе “Основы эмбриогенеза злаков” (1991) выделены пять фаз эмбриогенеза представителей этого семейства: зигота, двуклеточный зародыш, глобулярный зародыш, видимая морфологическая дифференциация и инициальный органогенез, созревающий зародыш. Авторы анализируют происходящие во время каждой фазы процессы морфологической, биохимической, физиологической и ультраструктурной реорганизации клеток, становление полярности и специализации органов зародыша, а также дают оценку значения каждой фазы для всего хода эмбриогенеза злаков.

Однако, несмотря на представленные в литературе периодизации эмбриогенеза злаков, в практике биотехнологических исследований с применением эмбриокультуры *in vitro*, за редким исключением (Zuraida et al., 2011; Голева и др., 2014), абсолютное большинство исследователей не сообщают, на какой именно стадии (фазе, периоде, этапе) развития находится инокулируемый незрелый зародыш злаков. Как правило, указывается время, прошедшее от опыления до инокуляции, или длина инокулируемого зародыша (Митич и др., 2009; Slesak et al., 2013; Никитина, Хлебова, 2014; Спивак и др., 2014; Zhang et al., 2015; Бычкова, 2016; Noga et al., 2016 и др.); в ряде публикаций в качестве экспланта указывается “незрелый зародыш”, без детализации (Григорьева, Шлецер, 2006; Carciofi et al., 2012). Подход к определению стадии развития инокулируемого зародыша по времени после опыления применяется и при других исследованиях злаков, например, протеомном анализе зародышей риса (Xu et al., 2011). Причина такого подхода, по-видимому, заключается в отсутствии морфологических критериев временных границ стадий (фаз, периодов, этапов) эмбриогенеза злаков, удобных в биотехнологических исследованиях, особенно при массовой сезонной работе. Решить эту проблему предназначена периодизация эмбриогенеза пшеницы (Круглова, 2012в; Kruglova, 2013). Автор предлагает оценивать стадии развития зародышей пшеницы согласно временным (сутки после

искусственного опыления) и морфологическим критериям (в частности, длина зародыша), выделяя при этом в эмбриогенезе этап недифференцированного зародыша (стадии: зигота, двуклеточный зародыш, четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш), этап морфологической дифференциации зародыша (стадия органогенеза в трех подстадиях) и этап дифференцированного зародыша (стадии сформированного зародыша и зрелого зародыша).

Установлено, что для успешного культивирования *in vitro* незрелых изолированных зародышей злаков на самых ранних стадиях (зигота, дву- и четырехклеточный зародыш) необходимо их сокультивирование с микроспорами в качестве клеток-"нянек" (Bakos et al., 2003) или использование факторов кондиционирования (Zhang et al., 2015), однако это придает биотехнологическим экспериментам дополнительные затраты. Поэтому для оптимизации биотехнологических исследований злаков так важно выявить стадию относительной автономности, начиная с которой изолированные незрелые зародыши разовьются в нормальные проростки и растения в условиях как *in vitro,* так и *ex vitro.*

Выявление стадии относительной автономности развивающихся зародышей злаков детально проведено на примере ячменя и пшеницы. Исследование незрелых зародышей культурных форм ячменя *Hordeum vulgare* L. согласно критерию формирования из таких зародышей нормальных проростков в культуре *in vitro* на безгормональной среде (по: Батыгина, Васильева, 1987) показало, что зародыши этого злака становятся относительно автономными на 10–12 сут (Игнатова, 2011) или, у других генотипов, на 13–14 сут (Лукьянюк, Игнатова, 1980) после опыления. Исследованиями этой критической стадии эмбриогенеза у обширной коллекции сортов и гибридных комбинаций яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. на основе более жесткого критерия – формирования зародышами полноценных регенерантов в условиях *ex vitro* (Круглова, Катасонова, 2009) – выявлена их относительная автономность, в зависимости от генотипа, на 12–15 сут после опыления (Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдимирова, 2011; Круглова, 2012а, 2012б, 2013, 2014; Круглова и др., 2018б, 2018г).

Такое некоторое несоответствие временных показателей становления относительной автономности зародышей ячменя и пшеницы можно объяснить климатическими условиями зон произрастания донорных растений (ячмень – Одесская область, юг Украины, пшеница – Уфимский район, Южный Урал) и погодными условиями вегетационного сезона, что не могло не сказаться в темпах развития зародышей. Однако главную причину различия сроков наступления стадии относительной автономности зародышей этих злаков мы видим в таксоноспецифичности этой критической стадии, которая характеризуется комплексом морфогенетических и физиолого-биохимических признаков зародыша у представителей конкретного таксона (в данном случае – вида). Аналогичный таксоноспецифичный "разброс" проявления стадии относительной автономности демонстрируют и исследованные в этом отношении зиготические/соматические зародыши двудольных. Так, согласно сводке, приведенной в работе В.Е. Васильевой, Т.Б. Батыгиной (1997), у зиготических зародышей видов сем. Brassicaceae это сердечковидная стадия (*Arabidopsis thaliana, Capsella bursa-pastoris*) и стадия дифференциации апекса побега (*Raphanus sativus*); у зиготических зародышей видов сем. Fabaceae – сердечковидная (*Phaseolus coccineus*), торпедовидная (*Vicia faba*) и стадия дифференциации семядолей (*Glycine max*); у соматических зародышей вивипарных видов рода *Bryophyllum* (сем. Crassulaceae) – торпедовидная стадия со сформированными семядолями и почечкой с двумя примордиями листьев (*B. daigremontianum*) и торпедовидная стадия при выходе корней из тканей материнского листа (*B. calycinum*).

Важно отметить, что использование биологического феномена критической стадии автономности легло в основу успешной разработки биотехнологического приема embryo resque ("спасение зародыша") (обзор: Kumari et al., 2018) по отношению к гаплоидным зародышам, полученным с помощью так называемого метода "bulbosum" при межвидовом скрещивании культурных форм ячменя *Hordeum vulgare* L. с гаплопродюсером – многолетней самостерильной луковичной формой ячменя *Hordeum bulbosum* 2*x* (по: Devaux, 2003). Такие гаплоидные зародыши, обычно дегенерировавшие в гибридных зерновках из-за раннего прекращения развития эндосперма, нормально развивались на содержащих гормоны средах, имитирующих эндосперм, будучи изолированными на 8–12 сут после опыления, хотя, строго говоря, не проявляли при этом относительную автономность согласно критерию прорастания на безгормональной среде в условиях *in vitro*. Метод "bulbosum" позволил получить жизнеспособные гибридные гаплоидные регенеранты ячменя, которые после диплоидизации активно использовались в генетических и селекционных программах в качестве гомозиготных линий (Лукьянюк, Игнатова, 1980; Лукьянюк, 1983; Игнатова, 2011). Интересно, что успехи, достигнутые в биотехнологических исследованиях ячменя этим методом, положили начало поиску эффективных гаплопродюсеров для получения гаплоидов пшеницы. Проводились эксперименты по скрещиванию пшеницы и *Hordeum bulbosum* 4*x* (Snape et al., 1979 и др.), пшеницы и кукурузы (Laurie, Bennet, 1986 и др.), однако гаплоидные зародыши гибли на са-

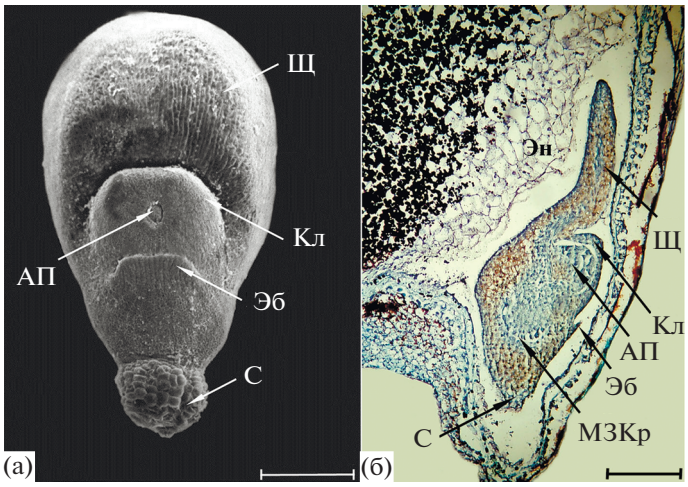

Рис. 1. Зародыш пшеницы в стадию относительной автономности по данным сканирующей электронной (а) и световой (б) микроскопии. Условные обозначения: АП – апекс побега, Кл – колеоптиль, МЗКр – меристема зародышевого корня, С – суспензор, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Эн – эндосперм. Шкала: 200 мкм. (а) – по: Сельдимирова и др., 2016; (б) – ориг. данные.

мых ранних стадиях развития. Такие результаты лишний раз свидетельствуют о важности выявления стадии относительной автономности в биотехнологических исследованиях как каждого вида злаков, так и их гибридов.

СТАТУС ЗАРОДЫША ЗЛАКОВ В КРИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АВТОНОМНОСТИ

Несмотря на важность проблемы, статус зародыша растений именно в критической стадии относительной автономности изучен крайне недостаточно. Большой интерес в этом плане вызывают единственные пока детальные цитофизиологические и биохимические исследования постепенного становления относительной автономности зародыша в семени лотоса *Nelumbo nucifera* (сем. Nelumbonaceae). Исследователи выявили морфогенетические (размер и степень дифференциации зародыша, соотношение размеров зародыша и окружающих тканей, относительную скорость роста по сухой массе и длине зародыша), биохимические (активность определенных ферментов, содержание растворимых сахаров и стадиеспецифичных белков, появление крахмальных зерен в семядолях) и морфологические (позеленение почечки) показатели зародыша лотоса в стадии относительной автономности – торпедовидной стадии с хорошо развитой почечкой (Васильева, Батыгина, 1981; Vasilyeva et al., 1987).

Специальных исследований, посвященных оценке гистологического статуса зародышей злаков в критической стадии относительной автономности, в литературе представлено также немного. В сводке, приведенной в работе В.Е. Васильевой, Т.Б. Батыгиной (1997) со ссылкой на работы по пшенице (Калинин, 1956; Sharma, Gill, 1982; Symons et al., 1983), рису (Давоян, Сметанин, 1979) и ячменю (Лукьянюк, Игнатова, 1980; Лукьянюк, 1983), в качестве таковой указана стадия дифференциации щитка и апекса побега. Отметим, что стадия дифференциации щитка и апекса побега зародыша злаков относится к более общей фазе органогенеза (по периодизации: Батыгина, 1987, 1997а) или этапу морфологической дифференциации зародыша (по периодизации: Круглова, 2012в; Kruglova, 2013).

Выше были проанализированы работы по детальному выявлению стадии относительной автономности зародышей ячменя и пшеницы по времени после опыления: у ячменя – на 10–14 сут, у пшеницы – на 12–15 сут. В своей монографии С.А. Игнатова (2011) не указывает, на какой стадии развития находятся относительно автономные зародыши ячменя. Тем не менее, на приведенном в этой монографии рисунке можно видеть, что в таком зародыше уже заложились щиток, апекс побега, колеоптиль, которые находятся в процессе активного формирования, а также обособлена меристема зародышевого корня. У зародыша пшеницы в стадии относительной автономности на 12–15 сут после опыления помимо формирующихся щитка, апекса побега, колеоптиля и обособленной меристемы зародышевого корня дифференцирован также и эпибласт (рис. 1а, 1б). В целом, сравнение гистологических показателей зародышей ячменя и пшеницы в критическую стадию относительной автономности свидетельствует об их принципиальном сходстве.

Отметим, что инокуляция незрелых зародышей пшеницы на немного более ранней стадии разви-

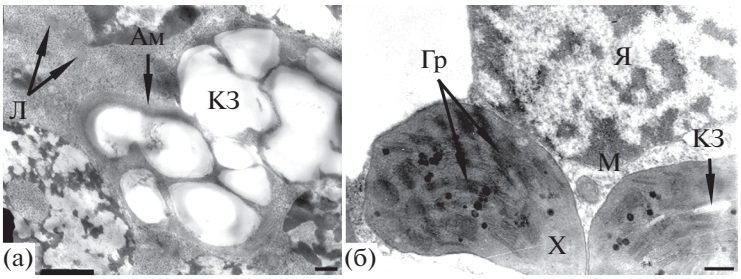

Рис. 2. Клетки щитка (а) и апекса побега (б) зародыша пшеницы в стадию относительной автономности по данным трансмиссионной электронной микроскопии. Условные обозначения: Ам – амилопласт, Гр – граны хлоропластов, КЗ – крахмальное зерно, Л – липидные капли, М – митохондрия, Х – хлоропласт, Я – ядро. Шкала: (а) – 500 нм, (б) – 200 нм. По: Сельдимирова и др., 2017б.

тия (7–9 сут после опыления, начало дифференциации органов) не приводила к формированию нормальных проростков на безгормональной среде *in vitro,* однако такие зародыши давали начало морфогенным каллусам на гормон-содержащих средах (Круглова, 2019; Круглова и др., 2019а).

В целом, уточненные гистологические данные дают основание полагать, что критической стадией относительной автономности зародышей злаков следует считать стадию не только дифференциации щитка, апекса побега, но и ряда других органов (каких именно – зависит от вида злака). В общем виде такую стадию мы предлагаем называть стадией дифференциации всех органов, свойственных зародышу злаков.

В работе О.А. Сельдимировой и др. (2017б) приведены данные ультраструктурных исследований клеток формирующегося зародыша пшеницы на 15–17 сут после опыления (частично соответствует стадии относительной автономности. – *Авт.*). Выявлено, что клетки щитка такого зародыша содержат липидные капли и крупные амилопласты, аккумулирующие крахмал (рис. 2а). В клетках апекса побега имеются митохондрии и единичные хорошо развитые хлоропласты (рис. 2б).

Представленные в этой работе данные о наличии липидных капель и об аккумуляции крахмала в клетках щитка зародыша пшеницы свидетельствуют о синтезе в этих клетках конституционных веществ, а в целом об их высокой метаболической активности. Это подтверждается и наличием в клетках апекса побега такого зародыша хорошо развитых митохондрий и пластид в виде хлоропластов.

Данные о впервые выявленных хорошо развитых хлоропластах в клетках апексов побегов зародышей пшеницы на 15–17 сут после опыления вызывают большой интерес. По-видимому, эти хлоропласты, как и все пластиды растительных клеток, берут начало от пропластид меристематических клеток (по: Кузнецов, 2018), в данном случае – клеток меристемы апекса побега. Представленные результаты позволяют охарактеризовать такие зародыши пшеницы как обладающие свойством хлорофиллоносности, а пшеницу отнести к группе хлороэмбриофитов (Жукова, 1997а; Puthur et al., 2013). Можно полагать, что выявленные ультраструктурные показатели “эмбрионального фотосинтеза” в клетках апексов побегов зародышей пшеницы связаны с началом формирования фотосинтетической системы будущего проростка.

Безусловно, важно охарактеризовать структуры, окружающие относительно автономный зародыш злаков. Из рис. 1а видно, что зародыш пшеницы своим щитком входит в контакт с хорошо развитым эндоспермом – гетерогенной тканью, согласно классическому пониманию служащей источником питания для развивающегося зародыша и резервуаром запасных веществ, необходимых для прорастания зародыша (по: Жукова, 1997б). Заметим, что в условиях культуры *in vitro* эндосперм заменяется специально подобранными питательными средами, способствующими дальнейшему нормальному развитию незрелых зародышей, изолированных и инокулированных на стадии относительной автономности.

В целом, зародыш злаков, находящийся в критической стадии относительной автономности, по своему морфологическому и гистологическому статусу готов к самостоятельному (автономному) развитию, независимо от материнского организма. Готовность таких зародышей к самостоятельному развитию характеризуется и рядом физиологических признаков, главным образом наличием в них эндогенных гормонов (независимость от экзогенных гормонов подтверждается успешным культивированием относительно автономных зародышей *in vitro* на безгормональной среде).

Известно, что собственная гормональная система растений формируется постепенно в ходе эмбриогенеза и активно участвует в регуляции процессов роста и развития зародышей. Этот важный вопрос изучается главным образом при анализе последовательных стадий эмбриогенеза двудольных (особенно у модельного растения –

Arabidopsis thaliana) путем выявления содержания в зародышах ауксинов и цитокининов – ведущих гормонов морфогенеза растений, а также "гормона стресса" – абсцизовой кислоты (АБК) (обзоры: Jenik, Barton, 2005; Muller, Sheen, 2008; Möller, Weijers, 2009; Finkelstein, 2010; Miransaria, Smithc, 2014; Robert et al., 2015). Установлено, например, что градиент ауксинов способствует формированию апикально-базальной оси в зародыше (Hamann, 2001; Friml et al., 2003) и влияет на спецификацию апикальных меристем зародышевого побега и корня (De Smet et al., 2010). Порядок и поддержание локальной аккумуляции ауксинов и цитокининов и их взаимодействие обеспечивает не только ход эмбриогенеза (Sauer, Friml, 2008; Rademacher et al., 2012; Cheng et al., 2013), но и постэмбриональное развитие растений (обзоры: Su et al., 2011; Schaller et al., 2015). Повышенное содержание АБК совпадает преимущественно с поздними стадиями развития зародышей (обзор: Finkelstein, 2010), покоем и прорастанием семян (обзоры: Nambara et al., 2010; Chaumont, Tyerman, 2014).

Большое внимание уделяется выявлению генов, контролирующих гормональную регуляцию эмбриогенеза *Arabidopsis thaliana* (обзоры: Wendrich et al., 2015; Творогова, Лутова, 2018). Установлено, например, что гены MONOPTEROS и BODENLOS (Hamann et al., 2002; De Smet et al., 2010), а также гены семейства PIN (Friml et al., 2003) отвечают за ауксиновый сигналинг на ранних стадиях эмбриогенеза, тогда как гены LONELY GUY и DOF2.1 опосредуют синтез активных форм цитокинина для формирования сосудистой системы на поздних стадиях развития зародыша этого растения (De Rybel et al., 2014; Smet et al., 2019).

В результате многочисленных исследований установлена стимулирующая роль эндогенных гормонов и в соматическом эмбриогенезе *in vitro* двудольных, включая экспрессию генов при этом (обзоры: Jimenez, 2005; Harada et al., 2010; Rai et al., 2011; Mahdavi-Darvari et al., 2015; Altamura et al., 2016; Horstman et al., 2017; Круглова и др., 2018а, 2018в).

Отметим, что практически все указанные работы не связаны с выявлением роли эндогенных гормонов в становлении автономности зародыша двудольных, как относительной, так и полной. Исключение составляет проанализированная выше работа, посвященная комплексному исследованию зародыша лотоса в стадии относительной автономности – торпедовидной стадии с хорошо развитой почечкой. Помимо морфогенетических, биохимических, морфологических характеристик, авторы выявили и гормональные показатели зародышей этой стадии – появление в них АБК (Васильева, Батыгина, 1981; Vasilyeva et al., 1987).

Можно косвенно дать оценку роли эндогенных гормонов в становлении относительной автономности зародыша двудольных на примере *Arabidopsis thaliana* на основе выборочного анализа литературных источников, посвященных исследованию гормонов в развивающихся зародышах этого растения. При этом необходимо учитывать, что относительной автономности зародыша *A. thaliana* соответствует сердечковидная стадия (по: Meinke, 1994). Сам автор не использует понятие "автономность зародыша", однако отмечает, что сердечковидные зародыши *A. thaliana* характеризуются способностью прорастать на безгормональной среде *in vitro*. Как свидетельствует такой выборочный анализ литературных данных, в сердечковидную стадию сайты формирования примордиев семядолей в зародышах *A. thaliana* маркируются ауксиновыми максимумами, которые создаются главным образом с помощью транспортера PIN1 (Benkova et al., 2003; Sieburth et al., 2006) при участии гиббереллинов (Willige et al., 2011).

Что касается исследований гормональной системы зародышей злаков на разных стадиях эмбриогенеза, то они не так многочисленны, как у двудольных, достаточно отрывочны и отражены в единичных обзорах (например, Круглова и др., 2019б). Кроме того, в литературе представлены результаты сравнительно немногочисленных исследований эндогенных гормонов в целых завязях (Гусаковская и др., 2008) и зерновках (Rusmussen et al., 1997; Banowetz et al., 1999; Hess et al., 2002; Сельдимирова и др., 2018б) злаков.

Данные по выявлению генов, контролирующих гормональную регуляцию эмбриогенеза злаков, также немногочисленны в сравнении с аналогичными исследованиями двудольных. Так, у пшеницы (Zhao et al., 2014) и *Aegilops tauschii* (Zhao et al., 2015) изолированы и охарактеризованы гены семейства WOX, играющие роль координаторов транскрипции в ходе раннего эмбриогенеза этих злаков. В позднем эмбриогенезе у кукурузы выявлена индуцируемая АБК экспрессия генов глобулина GLB1 и GLB2 (Paiva, Kriz, 1994), у риса – экспрессия гена OSGH3-2 из семейства GH3, модулирующего уровни ауксинов и АБК (Du et al., 2012).

У злаков, так же как и у двудольных, установлена зависимость формирования и развития зародышей от ключевых гормонов морфогенеза растений – ауксинов и цитокининов, а также участие АБК в процессах сравнительно позднего эмбриогенеза.

Эндогенный ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) выявлен на всех последовательных стадиях эмбриогенеза пшеницы (Hess et al., 2002; Wilson et al., 2005; Fan et al., 2007; Сельдимирова и др., 2017а) и кукурузы (Jimenez, Bangerth, 2001). Установлено, например, равномерное распределение свободной ИУК в клетках проэмбрио кукурузы (Forestan et al., 2010); показана роль направленного полярного транспорта этого ауксина в

становлении билатеральной симметрии, клеточной дифференциации и органогенезе зародышей пшеницы (Fischer, Neuhaus, 1996; Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001) и кукурузы (Forestan et al., 2010); выявлено участие ИУК в формировании прокамбиального тяжа щитка на поздних стадиях эмбриогенеза пшеницы (Сельдимирова и др., 2017а). Аналогичные данные получены при оценке гормонального статуса зародышей при прямом/непрямом соматическом эмбриогенезе *in vitro* ряда злаков (Zhao et al., 2000; Przetakiewicz et al., 2003; Bouamama et al., 2011; Huang et al., 2012; Титова и др., 2016; Seldimirova et al., 2016; Сельдимирова и др., 2019). Выявление ИУК на всех последовательных стадиях эмбриогенеза подтверждается данными иммуногистохимической локализации этого гормона в клетках развивающихся и зрелых зародышей пшеницы (Сельдимирова и др., 2017а) и ячменя (Сельдимирова и др., 2018б).

Цитокинины также выявлены в процессе всего зиготического эмбриогенеза злаков, например, ячменя (Сельдимирова и др., 2018б), на всех стадиях развития зерновки пшеницы (Hess et al., 2002) и ячменя (Сельдимирова и др. 2018б), а также при прямом/непрямом соматическом эмбриогенезе *in vitro* пшеницы (Seldimirova et al., 2016; Галин и др., 2018). Однако данные по исследованию цитокининов в развивающихся зародышах злаков не так многочисленны, в сравнении с аналогичными данными по ауксинам.

В целом, анализ литературных данных подтверждает определяющую роль ауксинов и цитокининов в развитии зародышей злаков – как зиготических *in vivo*, так и соматических *in vitro*. Можно полагать, что ключевые гормоны морфогенеза – ауксины, влияющие на рост клеток, и цитокинины, влияющие на клеточные деления (по: Медведев, Шарова, 2011; Schaller et al., 2015), присутствуют и на стадии относительной автономности зародыша злаков (около 10–15 сут после опыления), хотя специальных исследований не проводилось. Действительно, стадия относительной автономности характеризуется быстрым ростом и активными клеточными делениями дифференцированных органов и апекса побега развивающегося зародыша, а значит, и несомненным участием ауксинов и цитокининов в этих процессах. Такое предположение подтверждается, например, результатами гормональных исследований сухой массы развивающихся зерновок пшеницы: на 12 сут после опыления в них отмечено резкое увеличение содержания ИУК и цитокининов, соответствующее быстрому увеличению размера зерновки (Hess et al., 2002), а также максимальным показателем содержания цитокининов в зерновках ячменя на 14 сут после опыления (Сельдимирова и др., 2018б). Кроме того, интенсивное окрашивание на ИУК отмечено в клетках апикальной части зародыша и в клетках развивающихся органов зародыша пшеницы в фазу органогенеза (Сельдимирова и др., 2017а), включающую стадию дифференциации апекса побега и органов (по периодизации: Батыгина, 1987, 1997а).

Что касается АБК, то у злаков, как и двудольных, повышенное содержание этого гормона также выявлено преимущественно в зародышах на поздних стадиях эмбриогенеза и в зрелых зерновках (Belefant-Miller et al., 1994; Paiva, Kriz, 1994; Zocchi, de Nisi, 1996; Kawakami et al., 1997; Suzuki et al., 2000; White et al., 2000; Hess et al., 2002; Fan et al., 2007; An, Lin, 2011; Wu et al., 2011). Так, резкий скачок содержания АБК отмечен в зрелых зерновках ячменя на 35 сут после опыления (Сельдимирова и др., 2018б). Такие данные можно объяснить тем, что этот гормон предотвращает преждевременное прорастание семян (обзор: Miransaria, Smithc, 2014), а также индуцирует синтез дегидринов – белков, участвующих в обезвоживании семян (обзоры: Аллагулова и др., 2003; Finkelstein, 2010). Кроме того, АБК активирует ферменты, катализирующие распад цитокининов, и ингибирует экспрессию генов биосинтеза цитокининов, что, в свою очередь, приводит к снижению активности клеточных делений и торможению ростовых процессов (обзор: Веселов и др., 2017).

Иммуногистохимическими исследованиями подтверждено, что эндогенная АБК откладывается в клетках зародыша пшеницы (Сельдимирова и др., 2017а) и ячменя (Сельдимирова и др., 2018а, 2018б) преимущественно на поздних стадиях эмбриогенеза, уже в сформированных органах; при этом окрашивание на АБК отмечается во всех клетках зародыша, но наиболее интенсивно – в клетках колеоризы (корневого влагалища) и нижней части щитка, прилегающей к оси зародыша. Выявлено, что на поздних стадиях эмбриогенеза ячменя в колеоризе инициируются молекулярные изменения, связанные с метаболизмом АБК, что приводит к разрушению колеоризы и прорастанию зародышевого корня (Barrero et al., 2009). Высказано мнение (Сельдимирова и др., 2018а), что АБК в позднем эмбриогенезе злаков участвует в синтезе активных форм кислорода, разрыхляющих клетки колеоризы, тем самым способствуя прорастанию зародышевого корня/корней, как это показано для клеток микропилярной части эндосперма у некоторых двудольных (Müller et al., 2006).

Важно подчеркнуть, что максимальный уровень эндогенной АБК отмечен также в зрелых соматических зародышах риса (Jiang et al., 2006; Huang et al., 2012) и ячменя (Bouamama et al., 2011) в условиях *in vitro*.

В целом, полученные данные подтверждают важную роль АБК в созревании зародышей злаков и переходе семян к покою, однако, согласно проанализированным литературным данным, этот гормон

не проявляет высокой активности в стадии относительной автономности зародышей злаков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Программа развития, характеризующаяся поливариантной детерминированностью процессов роста и развития, заложена уже на самых ранних этапах онтогенеза растений, в зиготе. Примером поливариантности полагают потенциальную способность зародыша к прорастанию, проявляющуюся не только в его нормальном прорастании и так называемом преждевременном прорастании, но и в автономности зародыша (полной и относительной. – *Авт.*) (по: Васильева, Батыгина, 1997).

На определенной таксоноспецифичной критической стадии эмбриогенеза незрелый зародыш растений становится относительно автономным, не зависимым от материнского организма. Выявление этой критической стадии у злаков согласно критерию развития изолированных зародышей на безгормональной питательной среде *in vitro* с формированием нормальных проростков (Батыгина, Васильева, 1987) показало, что у пшеницы (Калинин, 1956; Sharma, Gill, 1982; Symons et al., 1983), риса (Давоян, Сметанин, 1979) и ячменя (Лукьянюк, Игнатова, 1980; Лукьянюк, 1983) в таких зародышах дифференцированы щиток и апекс побега. В зародышах некоторых генотипов ячменя кроме щитка и апекса побега дифференцирован также колеоптиль и обособлена меристема зародышевого корня (Игнатова, 2011), а в зародышах ряда генотипов пшеницы дифференцирован и эпибласт (оригинальные данные). Таким образом, в относительно автономных зародышах злаков наличествуют органы, необходимые и достаточные для их дальнейшего нормального развития вне материнского организма: щиток – семядоля, колеоптиль, защищающий конус нарастания побега, и эпибласт, поставляющий воду развивающемуся зародышу (по: Батыгина, 1997а), а также обособлены апекс побега и меристема зародышевого корня.

Готовность относительно автономных зародышей злаков к самостоятельному развитию подтверждается ультраструктурными характеристиками клеток их органов, например, наличием липидных капель и крахмальных зерен в клетках щитка, а также хорошо развитых хлоропластов в клетках апекса побега (Сельдимирова и др., 2017б).

Относительно автономные зародыши злаков характеризуются и наличием эндогенной гормональной системы, представленной главным образом ауксинами и цитокининами как ключевыми гормонами морфогенеза. Независимость от экзогенных гормонов материнского организма подтверждается успешным культивированием таких зародышей *in vitro* на безгормональной среде, с формированием из них нормальных проростков в условиях *in vitro* и полноценных растений в условиях *ex vitro*.

В целом, относительно автономные незрелые зародыши злаков по своему морфологическому, гистологическому и физиологическому статусу готовы к не зависимому от материнского организма нормальному развитию и дальнейшему формированию растений. Иначе говоря, с этой критической стадии онтогенеза начинается переход зародыша (нового спорофита) на относительно самостоятельный путь развития, т.е. происходит автономизация онтогенеза (Батыгина, 1987; Васильева, Батыгина, 1997).

Использование таких незрелых зародышей имеет несомненное практическое значение, поскольку может способствовать ускорению прямого получения регенерантов биотехнологическим методом эмбриокультуры *in vitro*. В данном случае, согласно собственным данным, за счет инокуляции незрелого зародыша достигается выигрыш во времени не менее чем в 20 сут, в сравнении с использованием зрелых зародышей. Кроме того, при этом можно миновать использования дорогостоящего и трудоемкого этапа формирования каллусов. Все это особенно важно, когда цель биотехнологии состоит в минимизации сомаклональной изменчивости и образовании на конечном этапе *ex vitro* полноценных фертильных растений-регенерантов.

В то же время, несмотря на известную степень теоретической изученности проблемы автономности зародышей растений и практическое использование автономных зародышей в биотехнологических исследованиях, вопрос о механизмах становления этого биологического феномена до конца не решен. Далеки от окончательного решения и заслуживающие внимания эмбриологов вопросы, поставленные Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой еще в 2002 г.: как связана поливариантная способность зародыша к прорастанию с эволюционным процессом; почему автономность зародыша возникает раньше его естественного созревания; какие гены экспрессируются на стадии автономности (добавим: особенно – относительной автономности. – *Авт.*).

К этим важным вопросам следует добавить и вопрос о функциональном взаимодействии эндогенных гормонов на стадии относительной автономности зародыша. Действительно, способность гормонов влиять друг друга – одна из важных особенностей гормональной системы растений (Plant Hormones..., 2010). Хотя эта закономерность не вызывает сомнений, информация о влиянии одних гормонов на другие в развивающихся зародышах довольно противоречива. Особенно важно, на наш взгляд, проанализировать данные об одновременном накоплении и распределении эндо-

генных гормонов в относительно автономных зародышах, когда дочерний организм гормонально уже не зависит от материнского.

Способствовать решению этих и других важных вопросов, связанных с полной и относительной автономностью зародыша растений, могут дальнейшие цитофизиологические и молекулярно-генетические исследования последовательных стадий зиготического эмбриогенеза *in vivo,* особенно в сравнении с аналогичными исследованиями соматического эмбриогенеза в модельных условиях культуры *in vitro*. Несомненный интерес представляет дальнейшее изучение относительной автономности зародышей злаков в экспериментальных условиях эмбриокультуры *in vitro*, сравнение стадий развития зиготического и соматического зародыша (эмбриоида) выявление общих закономерностей и специфических черт этих процессов.

Работа выполнена в рамках договора о творческом сотрудничестве между УИБ УФИЦ РАН и БИН РАН на 2018–2023 гг. по темам № АААА-А18-118022190099-6 (лаборатория физиологии растений УИБ УФИЦ РАН, государственное задание Минобрнауки России № 075-00326-19-00) и № АААА-А18-118051590112-8 (лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН, а также частично поддержана грантом РФФИ № 17-04-01477).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // Биохимия. 2003. Т. 68. № 9. С. 1157–1165.

Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. Киев: Наукова думка, 1982. 164 с.

Батыгин Н.Ф. Онтогенез высших растений. М.: Агропромиздат, 1986. 100 с.

Батыгин Н.Ф. Физиология онтогенеза // Физиологические основы селекции растений / Под ред. Удовенко Г.В., Шевелухи В.П. СПб.: Изд-во ВИР, 1995. С. 14–92.

Батыгин Н.Ф. Системный подход в биологии и агрономии // Николай Федорович Батыгин: жизнь и творчество / Под ред. Батыгиной Т.Б. СПб.: Профессионал, 2007. С. 151–196.

Батыгина Т.Б. О возможности выделения нового типа эмбриогенеза Angiospermae // Доклады Академии наук СССР. 1968а. Т. 186. № 6. С. 1499–1502.

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез в роде *Triticum* (в связи с вопросами однодольности и отдаленной гибридизации у злаков) // Ботан. журн. 1968б. Т. 53. № 4. С. 480–490.

Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206 с.

Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997а. С. 528–538.

Батыгина Т.Б. Graminad-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997б. С. 520–526.

Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений // Онтогенез. 1983. Т. 14. № 3. С. 304–311.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Прикладные аспекты эмбриологии. Автономность зародыша и эмбриокультура цветковых растений // Ботан. журн. 1987. Т. 72. № 2. С. 155–161.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2002. 232 с.

Бычкова О.В. Оценка эффективности морфогенеза и регенерации яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biol. Sib. 2016. № 2(1). С. 139–149.

Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Культивирование *in vitro* зародышей и семяпочек лотоса, изолированных на разных стадиях развития // Физиол. раст. 1981. Т. 28. № 2. С. 319–327.

Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Автономность зародыша // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб: Мир и семья, 1997. С. 579–588.

Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений // Физиол. раст. 2017. Т. 64. № 1. С. 19–32.

Галин И.Р., Зайцев Д.Ю., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Участие цитокининов в начальных этапах эмбриоидогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Биомика. 2018. Т. 10. № 2. С. 141–145.

Голева Г.Г., Батлук Ю.А., Ващенко Т.Г., Черкасова Н.Н., Голев А.Д. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* // Вестник Воронежского гос. агр. ун-та. Сельскохоз. науки. 2014. № 3(42). С. 17–22.

Григорьева Л.П., Шлецер И.А. Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Изв. Алтайского гос. ун-та. Биология. 2006. № 3(41). С. 64–66.

Гусаковская М.А., Блинцов А.Н., Лебедева А.Ф. Сравнительный анализ пространственно-временного распределения эндогенных гормонов в завязях пшеницы и одуванчика в период активности яйцеклетки // Вестник Московского ун-та. Серия 16: Биология. 2008. № 3. С. 12–20.

Давоян Э.И., Сметанин А.П. Получение каллуса и регенерация растений риса // Физиол. раст. 1979. Т. 26. № 2. С. 323–328.

Жукова Г.Я. Хлорофиллоносность зародыша как признак классификации цветковых растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997а. С. 461–470.

Жукова Г.Я. Эндосперм // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя /

Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997б. С. 212–218.

Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.

Калинин Ф.Л. Физиолого-биохимические особенности эмбрионального развития растений; Автореф. ... д-ра биол. наук. М., 1956. 30 с.

Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития (генетический аспект). М.: Изд-во МГУ, 2002. 264 с.

Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012а. № 3. С. 57–61.

Круглова Н.Н. Оценка коллекции генотипов яровой мягкой пшеницы по устойчивости автономных зародышей на селективных средах *in vitro*, имитирующих засуху // Известия Самарского НЦ РАН. 2012б. Т. 14. № 1(9). С. 2243–2245.

Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012в. № 2. С. 21–24.

Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2013. № 1. С. 42–45.

Круглова Н.Н. Выявление автономности зародыша пшеницы как этап разработки экспресс-диагностической биотехнологии получения засухоустойчивых образцов // Пермский аграрный вестник. 2014. № 1(5). С. 38–43.

Круглова Н.Н. Органогенез злаков на ранних этапах онтогенеза *in vivo* как структурная основа экспериментальных исследований *in vitro* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 1. С. 36–50.

Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. биохим. культ. раст. 2009. Т. 41. № 2. С. 124–131.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Гистологический статус зародыша пшеницы в стадии органогенеза *in vivo*, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2019а. № 1. С. 25–29.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // Успехи соврем. биологии. 2019б. Т. 139. № 4. С. 326–337.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Известия Уфимского НЦ РАН. 2018а. № 2. С. 55–60.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Критическая стадия автономности зародыша пшеницы *in planta* // Биомика. 2018б. Т. 10. № 1. С. 1–6.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Участие абсцизовой кислоты в стимулировании соматического эмбриогенеза растений // Успехи соврем. биологии. 2018в. Т. 138. № 5. С. 516–528.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление относительной автономности *in planta* зиготических зародышей яровой мягкой пшеницы для оптимизации биотехнологических исследований // Известия Уфимского НЦ РАН. 2018г. № 3. С. 28–33.

Кузнецов В.В. Хлоропласты. Структура и экспрессия пластидного генома // Физиол. раст. 2018. Т. 65. № 4. С. 243–255.

Лукьянюк С.Ф. Разработка приемов *in vitro* для получения гаплоидов ячменя и тритикале: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1983. 18 с.

Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений. Одесса, 1980. 21 с.

Лыкова Н.А. Эффект превегетации: экологические последствия. СПб.: Наука, 2009. 311 с.

Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. В 2-х т. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2011. 253 с.

Митич Н., Додиг Д., Николич Р., Никонович С., Винтерхалтер Д., Винтерхалтер Б. Влияние условий выращивания донорных растений на культуру незрелых зародышей, выделенных из широко распространенных генотипов пшеницы // Физиол. раст. 2009. Т. 56. № 4. С. 596–602.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // Изв. Алтайского гос. ун-та. Биол. науки. 2014. Т. 3. № 1(83). С. 46–50.

Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М. Биология семян. СПб., 1999. 233 с.

Обручева Н.В. Переход от гормональной к негормональной регуляции на примере выхода семян из покоя и запуска прорастания // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 591–600.

Обручева Н.В. Гормональная регуляция в онтогенезе плодов у растений // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 1. С. 14–27.

Обручева Н.В., Антипова О.В. Морфология и физиология прорастания семян // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 667–680.

Основы эмбриогенеза злаков / Ред. Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А., Тарасенко Л.В., Шулаев В.К., Ильченко К.В., Майстров П.Д., Барабанова Е.А. Киев: Наукова думка, 1991. 176 с.

Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. М.: Наука, 1976. 508 с.

Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриологическая характеристика семейства злаковых // Бюлл. Гл. Ботан. сада АН СССР. 1978. № 109. С. 57–60.

Поддубная-Арнольди В.А. Характеристика семейств покрытосеменных растений по цитоэмбриологическим признакам. М.: Наука, 1982. 351 с.

Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии. М.; Л.: АН СССР, 1960. С. 263–285.

Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2017а. № 3(1). С. 114–118.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // Онтогенез. 2017б. Т. 48. № 3. С. 220–233.

Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Влияние АБК на созревание зародышей ячменя *in vivo*: результаты изучения дефицитного по АБК мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018а. Т. 1. № 4. С. 203–211.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018б. Т. 1. № 3. С. 134–142.

Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Способность к соматическому эмбриогенезу *in vitro* в каллусах пшеницы и ячменя определяется балансом содержания в них ИУК и АБК // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 3. С. 181–193.

Сельдимирова О.А., Титова Г.Е, Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Известия РАН. Серия биол. 2016. № 2. С. 155–161.

Сказкин Ф.Д. Критический период у растений по отношению к недостатку воды в почве. Л.: Наука, 1971. 120 с.

Спивак В.А., Минликаева К.И., Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. Особенности морфогенеза структурных элементов незрелых зародышей линий пшеницы, культивируемых *in vitro* // Бюлл. Бот. сада Саратовского ун-та. 2014. Вып. 12. С. 188–197.

Сравнительная эмбриология цветковых растений. Однодольные: Butomaceae – Lemnaceae / Отв. ред. Батыгина Т.Б., Яковлев М.С. Л.: Наука, 1990. 332 с.

Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. М.-Л.: Наука, 1966. 610 с.

Творогова В.Е., Лутова Л.А. Генетическая регуляция зиготического эмбриогенеза у покрытосеменных растений // Физиол. раст. 2018. Т. 65. № 1. С. 3–17.

Терёхин Э.С. Семя и семенное размножение. СПб.: Мир и семья, 1996. 376 с.

Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. Алматы: ИББР КН МОН РК, 2012. 208 с.

Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Батыгина Т.Б. Феномен “сиамских зародышей” у злаков *in vivo* и *in vitro*: кливажная полиэмбриония и фасциации // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 3. С. 152–169.

Цингер Н.В. Семя, его развитие и физиологические свойства. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 285 с.

Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений. Принципы организации и типизация: Дис. ... д-ра биол. наук. СПБ.: БИН РАН, 1995. 479 с.

Шамров И.И. Эмбриогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 297–307.

Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение / Под ред. Батыгиной Т.Б. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 350 с.

Шамров И.И., Анисимова Г.М. Особенности преобразования семязачатка в семя у *Luzula pedemontana* (Juncaceae) // Ботан. журн. 1993. Т. 78. № 12. С. 24–44.

Шамров И.И., Никитичева З.И. Морфогенез семяпочки и семени у *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae): структурное и гистохимическое исследование // Ботан. журн. 1992. Т. 77. № 4. С. 45–60.

Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора) / Ред. колл. Берг Р.Л., Махотин А.А., Яблоков А.В. Изд. второе, перераб. и доп. М.: Наука, 1968. 451 с.

Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. 824 с.

Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 2000. 652 с.

Altamura M.M., Della Rovere F., Fattorini L., D'Angeli S., Falaska G. Recent advances on genetic and physiological bases of *in vitro* somatic embryo formation // *In vitro* Embryogenesis in Higher Plants / Eds. Germana M.A., Lambardi M. Springer, N.Y., 2016. P. 47–85.

An Y.-Q., Lin L. Transcriptional regulatory programs underlying barley germination and regulatory functions of gibberellin and abscisic acid // BMC Plant Biol. 2011. V. 11. 24 p. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-105

Bakos F., Darko E., Ponya Z., Barnabas B. Regeneration of fertile wheat plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. V. 74. P. 243–247.

Banowetz G.M., Ammar K., Chen D.D. Temperature effects on cytokinin accumulation and kernel mass in a dwarf wheat // Ann. Bot. 1999. V. 83. P. 303–307.

Barrero J.M., Talbot M.J., White R.G., Jacobsen J.V., Gubler F. Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 1006–1021.

Batygina T.B. Critical periods used to embryonal structures // XVII Congr. on Sexual Plant Reproduction: Abstr. Lublin, 2002. P. 33.

Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. P. 107–120.

Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Some aspects of embryo-culture (autonomy of embryo) of flowering plants // Phytomorphology. 1987. V. 37. P. 283–288.

Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Some aspects of autonomy of embryo in flowering plants // Phytomorphology. 1988. V. 38. P. 293–297.

Belefant-Miller H., Fong F., Smith D. Abscisic acid biosynthesis during corn embryos development // Planta. 1994. V. 195. P. 17–21.

Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Tichmann T., Seifertova D., Jurgens G., Friml J. Local, efflux-dependent

auxin gradients as a common module for plant organ formation // Cell. 2003. V. 115. P. 591–602.

Bouamama B., Salem A.B., Youssef F.B., Chaieb S., Jaafoura M.-H., Mliki A., Ghorbel A. Somatic embryogenesis and organogenesis from mature caryopses of North African barley accession "Kerkena" (*Hordeum vulgare* L.) // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 2011. V. 47. P. 321–327.

Capron A., Chatfield S., Provart N., Berleth T. Embryogenesis: pattern formation from a single cell // The Arabidopsis Book. Rockville, MD: The American Society of Plant Biologists, 2009. P. 1–28.

Carciofi M., Blennow A., Nielsen M.M., Holm P.B., Hebelstrup K.H. Barley callus: a model system for bioengineering of starch in cereals // Plant Methods. 2012. V. 8. 10 p. https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-36

Chaumont F., Tyerman S.D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 1600–1618.

Cheng Z.J., Wang L., Sun W. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3 // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 240–251.

De Rybel B., Abidi M., Breda A., Wendrich J., Smit M., Novak O., Yamaguchi N., Yoshida S., Isterdael G., Palovaara J., Nijsse B., Boekschoten M.V., Hooiveld G., Beeckman T., Wagner D., Ljunq K., Fleck C., Weijers D. Plant development. Integration of growth and pattering during vascular tissue formation in *Arabidopsis* // Science. 2014. V. 345. P. 1255215. https://doi.org/10.1126/science.1255215

De Smet I., Lau S., Mayer U., Jurgens G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life // Plan J. 2010. V. 61. P. 959–970.

Delporte F., Pretova A., du Jardin P., Watillon B. Morphohistology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1455–1470.

Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method // Doubled Haploid Production in Crop Plants / Eds. Maluszynski M., Kasha K.J., Foster B.P., Szareiko I. Jan: Springer Science+Business Media, LLC, 2003. P. 15–19.

Du H., Wu N., Fu J., Wang S., Li X., Xiao J., Xiong L. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 6467–6480.

Elhiti M., Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: An overview // Plant Embryo Culture: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) / Eds. Thorpe T.A., Yeung E.C. N.Y.: Humana Press, 2011. V. 170. P. 229–255.

Fan G.-Q., Liu F., Shao Q.-Q., Ren W.-J. Relations among wheat (*Triticum aestivum* L.) protein, starch contents and endogenous hormone contents during kernel development // Plant Physiol. Comm. 2007. V. 43. P. 36–40.

Finkelstein R.R. The role of hormones during seed development and germination // Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2010. P. 549–573.

Fischer C., Neuhaus G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots // Plant J. 1996. V. 9. P. 659–669.

Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G. Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of auxin polar transport // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 1767–1780.

Fischer-Iglesias C., Sundberg B., Neuhaus G., Jones A.M. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat // Plant J. 2001. V. 26. P. 115–129.

Forestan C., Meda S., Varotto S. ZmPIN1-Mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 1373–1390.

Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwartz H., Hamann T., Offringa R., Jurgens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* // Nature. 2003. V. 426. P. 147–153.

Goldberg R., de Paiva G., Yadegari R. Plant embryogenesis: Zygote to seed // Science. 1994. V. 266. P. 605–614.

Hamann T. The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis // Plant Growth Regul. 2001. V. 20. P. 292–299.

Hamann T., Benkova E., Baurle I., Kientz M., Jurgens G. The *Arabidopsis* BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo pattering // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 1610–1615.

Harada J.J., Belmonte M.F., Kwong R.W. Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic) // LS. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2010. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002042.pub2

Hess J.R., Carman J.G., Banowetz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony // Plant Physiol. 2002. V. 159. P. 379–386.

Horstman A., Bemer M., Boutilier K. A transcriptional view on somatic embryogenesis // Regeneration. 2017. V. 4. P. 201–216.

Huang W.-L., Lee Ch.-H., Chen Y.-R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress // Plant. Cell, Tiss. Org. Cult. 2012. V. 108. P. 257–263.

Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I. Plant tissue culture: current status and opportunities // Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Intech., 2012. P. 1–21. https://doi.org/10.5772/50568

Jenik P.D., Barton M.K. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis // Development. 2005. V. 132. P. 3577–3585.

Jiang H., Chen J., Gao X.L., Wan J., Wang P.R., Wang X.D., Xu Z.J. Effect of ABA on rice callus and development of somatic embryo and plant regeneration // Acta Agron. Sin. 2006. V. 32. P. 1379–1383.

Jimenez V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis // Plant Growth Regul. 2005. V. 47. P. 91–110.

Jimenez V.M., Bangerth F. Hormonal status of maize initial explants and the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro* // Plant Sci. 2001. V. 160. P. 247–257.

Kawakami N., Miyake Y., Noda K. ABA insensitivity and low ABA levels during seed development of non-dormant wheat mutants // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 1415–1421.

Kruglova N.N. Periodization of wheat embryo structure development on the basis of anatomical and morphologi-

cal criteria // Modern Phytomorphology. 2013. V. 4. P. 181–183.

Kumari P., Thaneshwari Rahul. Embryo resque in horticular crops // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2018. V. 7. P. 3350–3358.

Laurie D.A., Bennet M.D. Wheat × maize hybridization // Can. J. Genet. Cytol. 1986. V. 28. P. 313–316.

Mahdavi-Darvari F., Noor N., Ismanizan I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2015. V. 120. P. 407–422.

Meinke D.W. Seed development in *Arabidopsis thaliana* // Arabidopsis / Eds. Meyerowith E.M., Somerwille C.R. Cold Spring Harber, N.Y.: Cold Spring Harber Laboratory Press, 1994. P. 253–295.

Meinke D.W. Molecular genetics of plant embryogenesis // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 1995. V. 46. P. 369–394.

Methods in Molecular Biology. V. 427: Plant Embryogenesis / Eds. Suarez M.E., Bozhkov P.V. Totowa; N.Y.: Humana Press, 2008. 184 p.

Miransaria M., Smithc D.L. Plant hormones and seed germination // Env. Exp. Bot. 2014. V. 99. P. 110–121.

Möller B., Weijers D. Auxin control of embryo patterning // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009. V. 1. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001545

Muller B., Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis // Nature. 2008. V. 453. P. 1094–1097.

Müller K., Tintelnot S., Leubner-Metzger G. Endosperm limited *Brassicaceae* seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 864–877.

Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K., Yano R., Seo M., Kamiya Y. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination // Seed Sci. Res. 2010. V. 20. P. 55–67.

Noga A., Skrzypek E., Warchoł M., Czyczylo-Mysza I., Dziurka K., Marcinska I., Juzon K., Warzecha T., Sutkowska A., Nita Z., Werwinska K. Conversion of oat (*Avena sativa* L.) haploid embryos into plants in relation to embryo developmental stage and regeneration media // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2016. V. 52. P. 590–597.

Paiva R., Kriz A.L. Effect of abscisic acid on embryo-specific gene expression during normal and precocious germination in normal and *viviparous* maize (*Zea mays*) embryos // Planta. 1994. V. 192. P. 332–339.

Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / Eds. Thorpe T.A., Yeung E.C. N.Y.; London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.

Plant Embryogenesis / Ed. Thorpe T.A. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. 344 p.

Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2010. 802 p.

Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 2003. V. 73. P. 245–256.

Puthur J.T., Shackira A.M., Saradhi P.P., Bartels D. Chloroembryos: a unique photosynthesis system // J. Plant Physiol. 2013. V. 170. P. 1131–1138.

Rademacher E.H., Lokerse A.S., Schlereth A., Llavata-Peris C.I., Bayer M., Kientz M., Rios A.F., Borst J.W., Lukowitz W., Jurgens G. Different auxin response machineries control distinct cell fates in the early plant embryo // Dev. Cell. 2012. V. 22. P. 211–222.

Raghavan V. Experimental Emryogenesis in Vascular Plants. London: Acad. Press, 1976. 603 p.

Raghavan V. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997. 609 p.

Raghavan V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2003. V. 39. P. 437–442.

Rai M.K., Shekhawat N.S., Gupta A.K. et al. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2011. V. 106. P. 179–190.

Reynolds Th. Plant embryogenesis // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 1–10.

Robert Boisivon H., Crhak Khaitova L., Mroue S., Frimova E. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 5029–5042.

Rostami H., Giri A., Nejad A.S.M., Moslem A. Optimization of multiple shoot induction and plant regeneration in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars using mature embryos // Saudi J. Biol. Sci. 2013. V. 20. P. 251–255.

Rusmussen R.D., Hole D., Carman J.G. Wheat kernel dormancy and +abscisic acid level following exposure to fluridone // J. Plant Physiol. 1997. V. 150. P. 440–445.

Sauer M., Friml J. Visualization of auxin gradients in embryogenesis // Methods Mol. Biol. 2008. V. 427. P. 137–144.

Schaller G.E., Bishopp A., Kieberc J.J. The Yin-Yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // The Plant Cell. 2015. V. 27. P. 44–63.

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2016. V. 52. P. 251–264.

Shamrov I.I., Anisimova G.M. Critical stages of ovule and seed development // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 2003. V. 45. P. 167–172.

Sharma H.C., Gill B.C. Effect of embryo age and culture media on plant growth and vernalization response in winter wheat // Euphytica. 1982. V. 31. P. 629–634.

Slesak H., Goralski G., Pawłowska H., Skucińska B., Popielarska-Konieczna M., Joachimiak A.J. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. P. 30–37.

Sieburth L., Muday G., King E., Benton G., Kim S., Metcalf K., Meyers L., Seamen E., Norman J. SCARFACE encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein pattering in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 1396–1411.

Smet W., Sevilem I., de Luis Balaguer M.A., Wybouw B., Mor E., Miyashima S., Blob B., Roszak P., Jacobs T.B., Boekschoten M., Hooiveld G., Sozzani R., Helariutta Y., de Rybel B. DOF2.1 controls cytokinin-dependent vascular cell proliferation downstream of TMO5/LHW // Curr. Biol. 2019. V. 29. P. 520–529.

Snape J.W., Chapman V., Moss L., Blanchard C.F., Miller T.E. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum* // Heredity. 1979. V. 42. P. 291–298.

Suzuki T., Matsuura T., Kawakami N., Noda K. Accumulation and leakage of abscisic acid during embryo development and seed dormancy in wheat // Plant Growth Regul. 2000. V. 30. P. 253–260.

Symons S.J., Angold R.E., Black M.A., Chapman J.M. Changes in the growth capacity of the developing wheat embryo // J. Exp. Bot. 1983. V. 34. P. 1541–1550.

Vasilyeva V.E., Batygina T.B. Autonomy of the embryo // Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts. V. 2. Seed / Ed. Batygina T.B. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA, 2006. P. 375–382.

Vasilyeva V.E., Batygina T.B., Titova G.E. Morpho-physiological correlations in the development of the reproductive structures of *Nelumbo nucifera* Gaertn. // Phytomorphology. 1987. V. 37. P. 349–358.

Wareing F.P., Phillips I.D.J. Growth and Differentiation in Plants. Oxford: Pergamon press, 1981. 343 p.

Wendrich J.R., Möller B.K., Uddin B., Radoeva T., Lokerse A.S., Rybel B.D., Weijer D. A set of domain-specific markers in the *Arabidopsis* embryo // Plant Reprod. 2015. V. 28. P. 153–160.

White C. N., Proebsting W.M., Hedden P., Rivin C.J. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 1081–1088.

Willige B.C., Isono E., Richter R., Zourelidou M., Schwechheimer C. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin-transport growth and development in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2011. Online publ. 12 p. https://doi.org/10.1105/tpc.111.086355

Wilson I., Barker G., Lu C., Coghill J., Beswick R., Lenton J., Edwards K. Alteration of the embryo transcriptome of hexaploid winter wheat (*Triticum aestivum* cv. Mercia) during maturation and germination // Funct. Integr. Genomics. 2005. V. 5. P. 144–154.

Wu K., Wang J., Kong Z., Ma Z.-Q. Characterization of a single recessive yield trait mutant with elevated endogenous ABA concentration and deformed grains, spikelets and leaves // Plant Sci. 2011. V. 180. P. 306–312.

Xu Y., Zhang W., Gao Y., Zhao Y., Guo L., Wang J. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*) // Planta. 2011. Online publ. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1535-4

Zhang W., Wang X., Fan R., Yin G., Wang K., Du L., Xiao L., Ye X. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos // J. Integr. Agricult. 2015. V. 14. P. 11–19.

Zhao J., Zhou C., Yang H.Y. Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. // Plant Cell Repts. 2000. V. 19. P. 321–326.

Zhao S., Jiang Q., Ma J. et al. Characterization and expression analysis of WOX5 genes from wheat and its relatives // Gene. 2014. V. 537. P. 63–69.

Zhao S., Jiang Q.-T., Ma J., Wang J.-R., Liu Y.-X., Chen G.-Y., Qi P.-F., Pu Z.-E., Lu Z.-X., Zheng Y.-L., Wei Y.-M. Characterization and expression analysis of WOX2 homeodomain transcription factor in *Aegilops tauschii* // Genet. Mol. Biol. 2015. V. 38. P. 79–85.

Zocchi G., de Nisi P. Physiological and biochemical mechanisms involved in the response to abscisic acid in maize coleoptiles // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 840–846.

Zuraida A.R., Naziah B., Zamri Z., Sreeramanan S. Efficient plant regeneration of Malaysian *indica* rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 1913–1921.

Embryo of Flowering Plants at the Critical Stage of Relative Autonomy of Embryogenesis (on the Example of Cereals)

N. N. Kruglova[1, *], G. E. Titova[2, 3], O. A. Seldimirova[1], A. E. Zinatullina[1], and D. S. Veselov[1]

[1]*Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

[2]*Komarov Botanical Institute, St. Petersburg, 197376 Russia*

[3]*St. Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia*

**e-mail: kruglova@anrb.ru*

Received July 5, 2019; revised September 25, 2019; accepted September 30, 2019

Autonomy is the special structural and functional state of the embryo, reflecting its ability to self-regulation, independence from the surrounding tissues and manifested in the ability to complete normal embryogenesis outside the mother's organism (full autonomy). Of particular interest is the relative autonomy of the embryo as one of the critical stages of embryogenesis, when the immature embryo becomes independent of a number of physiological factors of the maternal organism, in particular hormones (mainly auxins, cytokinins, ABA). In the article on the example of cereals and in comparison with representatives of other families of flowering plants the review of literature and own data on identification as a critical stage of relative embryo autonomy in embryo culture *in vitro* such as morphological, histological and physiological status of relatively autonomous embryos is given. Prospects of research of the problem of relative autonomy of embryogenesis of plants, and also use of autonomous embryos in biotechnological researches are discussed.

Keywords: embryo, embryogenesis, embryo autonomy (full, relative), cereals

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 19–34

ОБЗОРЫ

УДК 57.017.35;576.32.36;577.29;57.086.833;617.7

РОЛЬ РЕДОКС-СИСТЕМЫ В ИНИЦИАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ОТВЕТА НЕЙРАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2020 г. Ю. В. Маркитантова[a], *, В. Н. Симирский[a]

[a] Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: yuliya.mark@gmail.com

Поступила в редакцию 29.05.2019 г.
После доработки 05.07.2019 г.
Принята к публикации 16.07.2019 г.

В обзоре рассматривается роль окислительного стресса (ОС) в первичном ответе клеток нейральных тканей глаза на повреждение и дегенеративные процессы. В основе развития ОС лежит нарушение равновесия (гомеостаза) редокс-системы в сторону окислительных процессов. ОС может использоваться как часть защитного механизма, инициирующего процессы заживления и регенерации поврежденных тканей. Нарушение редокс-гомеостаза и развитие ОС запускает в сетчатке воспалительную реакцию и иммунный ответ. Основные реакции на стресс – высвобождение АТФ, ионов кальция и активных форм кислорода (АФК) во внеклеточное пространство, привлечение экзогенных иммунных клеток, активация эндогенных макро- и микроглии, апоптоз нейронов – универсальны и консервативны у всех позвоночных. Тем не менее, при сходстве некоторых звеньев клеточных и молекулярных процессов, существуют эволюционно закрепленные функциональные различия регенерационного ответа клеток сетчатки, и финальный результат у разных видов позвоночных не равнозначен. Это определяет выбор стратегий регенерации: активация эндогенных стволовых/прогениторных клеток и/или репрограммирование дифференцированных клеток (пигментный эпителий сетчатки, глия Мюллера). Выявление ключевых сигнальных путей, через которые реализуется влияние ОС на регенерационные ответы при повреждении и патологии нейральных тканей глаза позвоночных, будет способствовать выбору оптимальных стратегий клеточной и/или генной терапии для активации внутреннего регенерационного потенциала нейральных тканей сетчатки у человека.

Ключевые слова: редокс-гомеостаз, окислительный стресс, активные формы кислорода, регенерация сетчатки позвоночных, эндогенные стволовые/прогениторные клетки, стратегии регенерации

DOI: 10.31857/S0475145020010048

В норме в клетках поддерживается баланс между окислительными и восстановительными процессами (окислительно-восстановительный баланс, редокс-баланс или редокс-гомеостаз), которые активно изучаются на протяжении многих лет в связи с ролью окислительного стресса (ОС) и антиоксидантной защиты в регуляции метаболизма клеток и канцерогенеза. Эти процессы обеспечивают реализацию основных функций клеток (пролиферация, миграция, дифференцировка, апоптоз), а также поддерживают их жизнеспособность (Trachootham et al., 2008; Moldogazieva et al., 2018; Borquez et al., 2016). На молекулярном уровне редокс-система регулирует синтез ДНК, экспрессию целого ряда генов, активность ферментов и сигнальных белков, проницаемость мембранных каналов и многие другие процессы (Ray et al., 2012; Bindoli, Rigobello, 2013; Sies et al., 2017). Редокс-система обеспечивает поддержание равновесной концентрации АФК и антиоксидантов и, соответственно, состоит из двух основных частей: прооксидантной и антиоксидантной. Прооксидантная система представлена низкомолекулярными АФК (гидроксильный радикал OH•, синглетный кислород $^1O_2$, супероксид O_2^-, перекись водорода, оксид азота NO и др.), которые генерируются в качестве побочных продуктов в дыхательной цепи митохондрий или синтезируются специализированными ферментами (НАДФ-оксидаза, синтаза оксида азота) (Bindoli, Rigobello, 2013; Emanuele et al., 2018). Молекулярные пути регуляторного действия АФК все еще недостаточно изучены, однако показана их ведущая роль во многих физиологических процессах. АФК и взаимодействующие с ними антиоксиданты рассматривают как функционально связанные редокс-активные молекулы, которые являются ключевыми компонентами окислительно-восстановительных процессов (Черенкевич и др., 2009; Moldogazieva et al., 2018). Антиоксидантная система включает низкомолекулярные антиоксиданты (витамин С, глутатион, таурин, мочевая кислота, цистеин, бета-каротин

и др.) и ферментные системы, которые нейтрализуют АФК (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксиредоксины) или восстанавливают окисленные белки и липиды (например, глутатионовая система ферментов) (Tokarz et al., 2013). Нарушение равновесия в сторону окислительных процессов ведет к ОС, в сторону восстановительных – к восстановительному стрессу (Perez-Torres et al., 2017). В основе ОС лежит накопление АФК, ведущее к преобладанию прооксидантов (окислителей) над антиоксидантами (восстановителями). АФК неустойчивы, но влияют на активность ряда ферментов (протеиназы, фосфатазы, фосфолипазы) и модулируют экспрессию факторов транскрипции, обеспечивая тем самым глобальные устойчивые изменения активности генов и клеточного метаболизма. Низкие концентрации АФК индуцируют экспрессию антиоксидантных ферментов и оказывают стимулирующее действие на пролиферацию и жизнеспособность клеток, средние – стимулируют воспалительные реакции, а высокие – вызывают разрушение мембран митохондрий и приводят к активации апоптоза и гибели клеток (Lushchak, 2011). Деструктивная активность АФК заключается в окислении белков, липидов и ДНК (Sies et al., 2017). Окисленные формы белков при избыточном накоплении могут агрегировать и вызывать дополнительный эндоплазматический стресс и реакцию на неструктурированный белок (Unfolded Protein Response, UPR) (Zhang et al., 2014).

Известно, что различные органы и ткани демонстрируют различную устойчивость к действию компонентов ОС. Считается, что это связано именно с особенностями работы антиоксидантных систем и метаболизма тканей, характером экспрессии общих ключевых ферментов защиты клеток и особенностями метаболизма тканей. В свою очередь, особенности метаболизма различных типов клеток связаны с устойчивостью к ОС через поддержание внутриклеточного редокс-потенциала (Kortuem et al., 2000; Isenmann et al., 2003).

Важное место редокс-система занимает в нормальном функционировании сетчатки глаза. Эта ткань, являясь производной частью нервной системы, высокочувствительна к развитию свободно-радикальных реакций. Сетчатка обладает повышенной метаболической активностью, подвержена постоянному воздействию света, характеризуется высоким уровнем полиненасыщенных жирных кислот на фоне низкой активности антиоксидантных ферментов, что обуславливает ее предрасположенность к постоянной генерации активных форм кислорода (Leveillard, Sahel, 2017).

Сетчатка имеет у разных представителей животного царства свои морфофункциональные особенности, однако общий план строения схож у всех позвоночных животных и человека (Kolb 2012; Lamb, 2013). Эта высокоорганизованная ткань, которая у позвоночных включает шесть основных типов нейронов (фоторецепторы, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, гаглиозные клетки, интерплексиформные нейроны) и четыре типа клеток радиальной глии (клетки Мюллера, астроциты, микроглия, олигодендроциты), выстилающих дно и боковую поверхность глазного бокала в виде радиальных слоев (Tsukamoto, 2018, Hoon et al., 2014) (рис. 1). Различают три ядерных слоя, состоящих из различных типов сенсорных нейронов, и двух сетчатых слоев, наружного и внутреннего, представляющих собой синаптические связи между нейронами сетчатки пограничных ядерных слоев. Наружный ядерный слой сетчатки состоит из светочувствительных клеток – палочек и колбочек фоторецепторов, участвующих в фототрансдукции. Наружные сегменты фоторецепторов находятся в тесном контакте с ретинальным пигментным эпителием (РПЭ) – однорядным слоем интенсивно пигментированных эпителиальных клеток. Клетки РПЭ находятся между фоторецепторами и сосудистой оболочкой и выполняют ряд физиологических функций – участвуют в защите фоторецепторов от избытка света, трансдукции зрительного сигнала, гомеостазе сетчатки (секреция факторов роста, регуляция баланса ионов в субретинальном пространстве), фагоцитозе слущивающихся дисков наружных сегментов фоторецепторов (Strauss, 2005; Mazzolini et al., 2015). РПЭ подстилает мембрана Бруха, которая состоит из компонентов эндотелия сосудистой оболочки, богатой капиллярами, и уплотненного фибриллярного слоя собственно базальной пластинки РПЭ (Amram et al., 2017).

Второй ядерный слой сетчатки – внутренний – сформирован интернейронами (биполяры, амакриновые и горизонтальные клетки). Благодаря биполярам осуществляется передача зрительного сигнала от фоторецепторов в слой ганглиозных клеток. Горизонтальные и амакриновые клетки, осуществляют горизонтальную связь между всеми клеточными элементами сетчатки (Tsukamoto, 2018; Kolb, 2013). Ядра ганглиозных клеток – нейроны второго порядка, образуют третий ядерный слой – ганглиозный, а их аксоны участвуют в формировании зрительного нерва (Sanes, Masland, 2015).

В наружном сетчатом слое осуществляются синаптические контакты между палочками и колбочками и вертикально ориентированными биполярными нейронами, во внутреннем сетчатом слое сигнал трансдукции переключается с биполяров на ганглиозные и амакриновые нейроны, в вертикальном и горизонтальном направлении. Наружный сетчатый слой образован синаптическими контактами между палочками/колбочками и биполярными клетками, а внутренний сетчатый слой осуществляет связь между биполярными и ганглиозные нейронами, а также горизонтальную

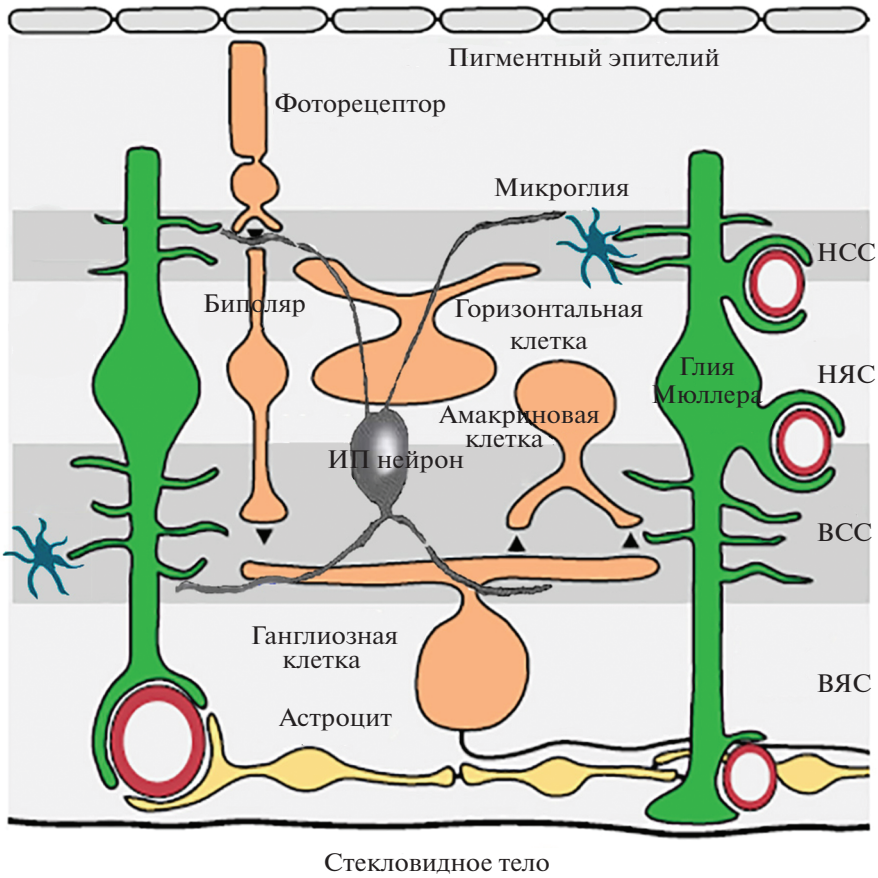

Рис. 1. Строение сетчатки глаза позвоночных (модифицировано по Newman, 2015). ИП нейрон – интерплексиформный нейрон, НСС – наружный сетчатый слой, НЯС – наружный ядерный слой, ВСС – внутренний сетчатый слой, ВЯС – внутренний ядерный слой.

связь между амакриновыми и горизонтальными нейронами (Kolb, 2007a, 2007b).

Во внутреннем ядерном слое сетчатки локализуются тела клеток глии Мюллера, которая пронизывает всю сетчатку, от наружной до внутренней пограничных базальных мембран (сформированных отростками этих клеток), локализованных на границе сетчатых слоев ткани. Глия Мюллера относится к макроглии сетчатки, осуществляет контакты со всеми типами составляющих нейронов, выполняя структурную и нейротрофическую функции (Subirada et al., 2018). В сетчатке различают и другие элементы макроглии, такие как астроциты, основные функции которых связаны с поддержанием структуры и метаболической активности нейронов сетчатки. В ответ на нейральную активность, астроциты способны выделять вазоактивные вещества (оксид азота, простагландины), которые регулируют тонус сосудов сетчатки (Kimelberg, 2010). В сетчатке присутствует также микроглия, которая представлена резидентной популяцией иммунокомпетентных клеток (Genini et al., 2014).

Кровоснабжение сетчатки осуществляется из центральной артерии сетчатки, питающей ее внутренние клеточные слои, и хориокапиллярами, обеспечивающими кровоснабжение наружных слоев (слой фоторецепторов, наружный ядерный и наружный сетчатый слои) (Selvam et al., 2018). Нейроны сетчатки, макроглия и микроглия, а также клетки стенок микрососудов (эндотелиоциты и перициты) взаимодействуют между собой и формируют гематоретинальный барьер, который регулирует поступление кислорода и трофических факторов к нейронам сетчатки и участвует в рециркуляции нейротрансмиттеров и продуктов метаболизма (Cunha-Vaz et al., 2011; Diaz-Coranguez et al., 2017; Trost et al., 2019).

Сетчатка чувствительна к ОС из-за высокого уровня потребления кислорода и воздействия света. В литературе накоплено немало данных о том, что ОС является одним из основных звеньев в развитии возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и нейродегенерации при глаукоме, являясь причиной первичного повреждения клеток РПЭ и повреждения ганглиозных клеток, соот-

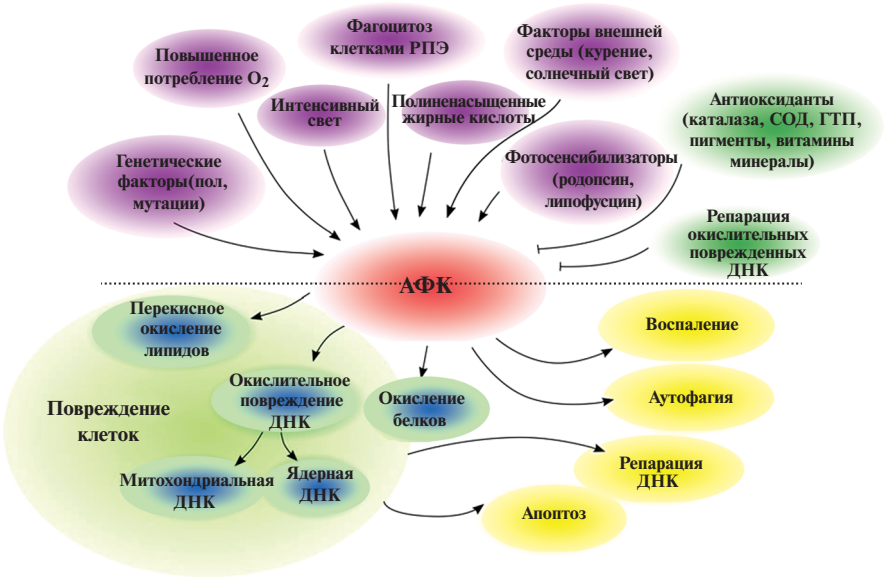

Рис. 2. Факторы генерации активных форм кислорода (АФК) и основные внутриклеточные последствия окислительного стресса (модифицировано по Tokarz et al., 2013). ГТП – глутатионпероксидаза; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий, СОД – супероксиддисмутаза. Фиолетовые метки – прооксидантные факторы, зеленые метки – антиоксидантные факторы.

ветственно (Beatty et al., 2000). Наиболее чувствительными к изменению редокс-потенциала являются РПЭ и фоторецепторы. АФК в фоторецепторах возникают в результате активности митохондрий (как побочный продукт цепи окислительного фосфорилирования) и в процессе фототрансдукции при действии света на светочувствительные пигменты палочек и колбочек (Masutomi et al., 2012; Roehlecke et al., 2013). В свою очередь, под действием АФК происходит перекисное окисление полиненасыщенных липидов (докозагексаеновая кислота и др.), которыми обогащены плазматические мембраны дисков фоторецепторов (Simon et al., 2016). Антиоксидантная система РПЭ представлена низкомолекулярными антиоксидантами (альфа-токоферол, ретинол, аскорбиновая кислота, глутатион) и ферментами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза) (Strauss, 2005). Антиоксидантная система фоторецепторов представлена каротиноидами, лютеином и зеаксантином, которые поглощают часть световых лучей и частично нейтрализуют АФК (Tokarz et al., 2013), а также рядом ферментов (глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза и др.) (Usui et al., 2011; Ueta et al., 2012) (рис. 2).

РПЭ также подвержен воздействию света, который вызывает окисление (обесцвечивание) меланина (Zareba et al., 2007), принимающего активное участие в “нейтрализации” АФК (прежде всего синглетного кислорода) (Seagle et al., 2005; Wang et al., 2006). Кроме того, РПЭ фагоцитирует диски фоторецепторов, обогащенные АФК и липофусцином (основной продукт окисления полиненасыщенных липидов) (Hunter et al., 2012). Таким образом, высокий уровень продукции АФК в клетках РПЭ и фоторецепторах, наряду с постоянным воздействием агрессивных экзогенных факторов (кислород, свет), определяют повышенный риск этих клеток к развитию ОС (Seagle et al., 2005; Wang et al., 2006). Активация реакций свободнорадикального окисления вызывает повреждение липидов биологических мембран, белков и нуклеиновых кислот, в результате чего накапливаются специфические маркеры окисления, такие как малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль, конечные продукты гликолиза, что приводит к патологической активации иммунной системы (Tate et al., 1995; Sun et al., 2006; Jacobs, Marnett, 2010; Keeling et al., 2018). Развитие этих процессов нарушает взаимодействие между фоторецепторами и РПЭ, ведет к накоплению продуктов распада клеток и липофусциновых гранул и образованию многочисленных друз и атипичных утолщений в мембране Бруха, что снижает центральное зрение (Blasiak et al., 2014).

На сегодняшний день выделяют несколько механизмов, которые могут привести к нейродегенеративному процессу в сетчатке: накопление внеклеточного глутамата, ОС, снижение уровня нейропротекторных факторов, которые синтезируются сетчаткой (Simo, Hernandez, 2014). В свете современных представлений о патогенезе нейродегенеративных заболеваний повреждение нейральных клеток протекает в виде каскада внутриклеточных реакций, включающих глутаматную эксайтотоксичность; повышение внутриклеточ-

ного уровня кальция и, соответственно, активацию кальций-зависимых ферментов; повышение продукции АФК, локальную воспалительную реакцию, и, в конечном итоге, развитие ОС. Окисление глутамата приводит к усиленному образованию супероксида в митохондриях (Fukui, Zhu, 2010), что имеет большое значение для генерации АФК в преимущественно глутаматергических нейральных сигнальных путях сетчатки (Williams, Dexter, 2014). На ранних этапах развития патологий сетчатки (дисплазия, ретинопатия) связанных с нарушением функций клеток, изменения в сетчатке еще носят обратимый характер. Поздние этапы характеризуются полной дегенерацией сетчатки, связанной с массовой гибелью специализированных нейронов и/или глии.

Интенсивные исследования последних лет убедительно продемонстрировали, что ОС нельзя однозначно рассматривать как негативный процесс для клеток, тканей и организма в целом. Напротив, он используется как часть защитного механизма, который, в частности, инициирует процессы заживления и регенерации поврежденных тканей (Roy, Levesque, 2006; Kozakowska et al., 2015; Galluzzi et al., 2016; Wan, Goldman, 2016). Повреждение сетчатки может быть следствием действия различных внешних и внутриклеточных факторов, которые могут затрагивать отдельные типы клеток и отдельные области сетчатки (такие как макула). Различают такие типы повреждения сетчатки как: 1) дегенерация клеток сетчатки из-за наследственных мутаций (Kumaramanickavel, 2016); 2) механическое повреждение (Zhao et al., 2014); 3) отслоение сетчатки (разобщение слоя РПЭ с фоторецепторами) (Nakazawa et al., 2006; Fisher et al., 2007); 4) повреждение сетчатки (прежде всего фоторецепторов и РПЭ) под воздействием света (ультрафиолетовое излучение, лазер) (Nakanishi-Ueda et al., 2013); 5) повреждение зрительного нерва (Sharma et al., 2014; Sato et al., 2018); 6) повреждение сетчатки как следствие системных заболеваний (диабет, гипертензия, болезнь Альцгеймера и др.) (Iqbal et al., 2014; 2019; Werdich et al., 2014). В результате перечисленных воздействий нарушается тканевой гомеостаз, и клетки испытывают стресс.

В процессе регенерации ткани можно выделить три основных этапа (модуля): 1) первичный ответ ткани на повреждение (заживление раны); 2) индукция регенерационного ответа и формирование бластемы; 3) восстановление структуры ткани за счет дифференцировки клеток бластемы (Galliot, Chera, 2010; Galliot, Ghila, 2010) (рис. 3). На первом этапе в ответ на стрессовую ситуацию наблюдается активная миграция в поврежденную ткань фагоцитов, активация эндогенных микро- и/или макроглии (глия Мюллера), нарушение гематоретинального барьера и дегенеративные изменения в фоторецепторах и ганглиозных клетках (Wan et al., 2012; Langhe et al., 2017). На втором этапе происходит активация эндогенных стволовых/прогениторных плюрипотентных клеток и/или репрограммирование дифференцированных клеток с их последующей пролиферацией и формированием бластемы (Chiba, Mitashov, 2007; Chiba, 2014). На последнем этапе в недифференцированных клетках бластемы происходит активация программ дифференцировки, в большей или меньшей степени сходных с аналогичными эмбриональными программами, и восстанавливается (полностью или частично) нормальная структура ткани (Inami et al., 2016). В настоящем обзоре мы остановимся на первых двух этапах, которые в совокупности и обеспечивают инициацию регенерационного ответа ткани.

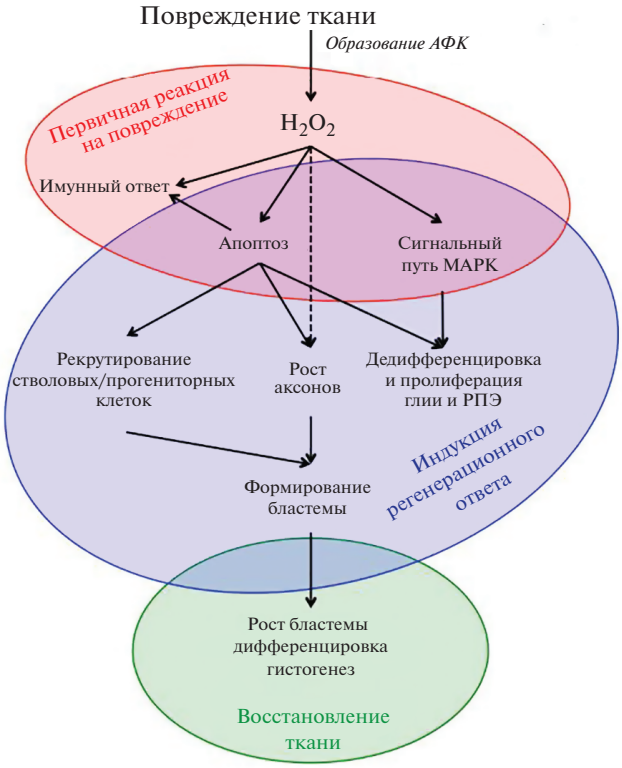

Рис. 3. Этапы (модули) регенерационного ответа сетчатки на повреждение (модифицировано по Meda et al., 2018). АФК – активные формы кислорода; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий.

На первом этапе, независимо от рода повреждающего воздействия, повреждение и гибель клеток (прежде всего, фоторецепторов и ганглиозных клеток) запускает в сетчатке воспалительную реакцию и иммунный ответ, которые способствуют восстановлению тканевого гомеостаза и заживлению раны. В зоне повреждения запускается каскад защитных реакций, медиаторами которых выступают ионы кальция, АТФ и АФК, высвобождающиеся в межклеточное пространство из поврежденных клеток (Mitchell et al., 2008;

Cordeiro, Jacinto, 2013). АТФ стимулирует увеличение концентрации внутриклеточного кальция и перекиси водорода посредством пуринергических рецепторов P2X7 (Mitchell et al., 2008). Противоположным эффектом обладает аденозин, который возникает при гидролизе АТФ под действием экзонуклеозидаз. Аденозин действует на A3-аденозиновые рецепторы и останавливает возрастание внутриклеточной концентрации кальция (Zhang et al., 2006). Внеклеточный кальций активирует окислительные ферменты (Duox, НАДФН-оксидазы) и стимулирует быстрый выброс перекиси водорода (Vriz et al., 2014). АФК, в основном относительно стабильная перекись водорода, диффундируют в соседние участки сетчатки. В результате создается градиент концентрации перекиси водорода, который выступает в качестве паракринного сигнала (Cordeiro, Jacinto, 2013). Усиление продукции внутриклеточных АФК ведет к интенсификации свободнорадикального окисления и развитию ОС (Suzuki, Mittler, 2012; Nakanishi-Ueda et al., 2013).

Повреждение нейральных тканей, сопровождаемое ОС, в совокупности с факторами воспаления, активирует ряд регуляторных факторов (Erler, Monaghan, 2015). На генном уровне после травмы тканей наблюдается активация вовлеченных в иммунный ответ генов и протоонкогенов (Zacks et al., 2006; Zacks, 2009). Повреждение сетчатки приводит к активации эндогенной микроглии, которая представляет популяцию первичных иммунокомпетентных клеток сетчатки (Akhtar-Schafer et al., 2018), и одновременно, вследствие нарушения проницаемости гематоретинального барьера, ведет к инфильтрации сетчатки иммунными клетками крови (моноциты/макрофаги) (Ma et al., 2017). Макрофаги продуцируют большие количества перекиси водорода, которая обеспечивает неспецифическую защиту за счет антисептического эффекта и модулирующего влияния на иммунные реакции в области повреждения ткани (Winterbourn, Kettle, 2013). Кроме того, перекись водорода привлекает в область повреждения дополнительные макрофаги, являясь для них хемоаттрактантом (Wang et al., 2015), а также вызывает апоптоз и гибель перицитов (Amano et al., 2005), тем самым еще больше разрушая гематоретинальный барьер. РПЭ играет при этом двоякую роль: с одной стороны, он секретирует экзосомы, которые содержат ангиогенный фактор VEGFR (Atienzar-Aroca et al., 2016) с другой стороны, в его клетках формируются инфламмасомы, принимающие участие в иммунной защите сетчатки (Akhtar-Schafer et al., 2018). Наиболее стабильные АФК (перекись водорода, оксид азота) служат посредниками в межклеточной передаче сигнала (van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014; Reczek, Chandel, 2015). Очевидно, что согласованная работа молекулярных факторов, усиленно продуцирующихся в клетках при повреждении, направлена на восстановление клеточного и метаболического гомеостаза сетчатки (Cuenca et al., 2014). В результате ОС часть клеток поврежденной сетчатки подвергается апоптозу, даже если в последствие происходит инициация пролиферации и репрограммирование клеток. Однако существует точка зрения, согласно которой продукция и ингибирование продукции АФК являются процессами, задействованными для стимуляции нейрогенеза (Hameed et al., 2015), и могут быть использованы для активации программы замещения утраченных нейронов.

АФК оказывают свое влияние на общий метаболизм клеток и, в частности, через обратимое окисление остатков цистеина в ключевых регуляторных белках, активируют сигнальные пути, специфичные для ОС, такие как JNK и MAPK, а также вызывают гибель клеток путем апоптоза (Zacks et al., 2006; Zacks, 2009; Vriz et al., 2014). Повреждение сетчатки (особенно при воздействии интенсивного света или токсинов) сопровождается массовой гибелью клеток в результате апоптоза и/или некроза (Nakanishi et al., 2013). Для успешной регенерации необходимо удалить остатки клеток, поэтому важную роль на начальных этапах регенерации играют процессы фагоцитоза. Утилизация апоптотических фрагментов клеток – одна из основных функций макрофагов, а также эндогенной микроглии, активированной под действием АФК. В условиях ОС микроглия мигрирует во внешние слои сетчатки, где участвует в утилизации фрагментов фоторецепторов и РПЭ (Cuenca et al., 2014). Следует отметить, что мигроглия способна фагоцитировать и нефрагментированные палочки, в случае пигментного ретинита (Zhao et al., 2015). Фагоцитарной активностью обладают и клетки РПЭ, которые утилизируют “отработанные” диски фоторецепторов в интактной сетчатке, а в условиях ОС активность клеток РПЭ возрастает, что проявляется в фагоцитозе апоптотических фрагментов других типов клеток (Sun et al., 2006).

Первичная реакция сетчатки на повреждение сменяется этапом репарации ткани, в результате которого происходит фиброзное заживление или полноценная регенерация ткани. Анализ репарации повреждений сетчатки у разных видов животных позволяет сделать вывод, что основные реакции (высвобождение АТФ, ионов кальция и АФК во внеклеточное пространство, привлечение иммунных клеток, активация макро- и микроглии, апоптоз нейронов) универсальны и консервативны у всех позвоночных (Bely, Nyberg, 2010; Ferretti, 2011; Neves et al., 2016). Однако в одних случаях они способствуют успешной регенерации (у рыб и амфибий), а в других (у млекопитающих) – ведут к массированной гибели клеток и фиброзному перерождению сетчатки (Murawa-

la et al., 2012; Erler, Monaghan, 2015). Совокупность данных, полученных на разных моделях, свидетельствует о том, что независимо от характера и степени повреждения сетчатки, основной реакцией составляющих ее клеток является развитие ОС. Все остальные процессы (фагоцитоз, апоптоз, аутофагия, глиоз), которые происходят в сетчатке и в норме, резко усиливаются на фоне ОС. В то же время факторы (клетки, регуляторные белки, сигнальные пути), которые обеспечивают переход от заживления раны к регенерации ткани, остаются до конца невыясненными (Galliot et al., 2017). Предполагается участие врожденной иммунной системы, в частности, Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) и АФК в репрограммировании и трансдифференцировке клеток при заживлении раны (Anders, Schaefer, 2014; Zhou et al., 2016).

Какой вклад вносит в процесс регенерации первичный ответ ткани на повреждение? Элиминация экзогенных макрофагов не влияет на регенерацию сетчатки рыб после ее повреждения, тогда как элиминация микроглии приводит к подавлению регенерации (Conedera et al., 2019). Очевидно, микроглия не только участвует в утилизации отмерших клеток, но и оказывает стимулирующее действие на процесс регенерации. Дополнительным активирующим фактором является гибель части клеток сетчатки в результате апоптоза, который запускается под действием перекиси водорода (Kaneko et al., 1999). Предполагают, что каспазы, активация которых ведет к апоптозу, одновременно усиливают секрецию факторов роста и простагландинов отмирающими клетками (Li et al., 2010) и в итоге активируют компенсационную пролиферацию оставшихся клеток и регенерацию ткани (так называемый “путь возрождения феникса”, “Phoenix Rising” pathway). С другой стороны, в результате апоптоза могут быть элиминированы клетки, которые поддерживают клеточный гомеостаз ткани путем ограничения пролиферации (Vriz et al., 2014). Таким образом, существует несколько типов критических воздействий на клетки сетчатки, которые могут стимулировать как чрезмерную пролиферативную активность клеток глии, так и приводить к гибели нейронов и дегенерации ткани.

Ранние молекулярно-генетические и клеточные процессы при повреждении или отслойке сетчатки позвоночных направлены, прежде всего, на защиту клеток от стресса, воспаления и дегенеративных изменений, но приводит у разных видов к разному финальному результату (Chiba, 2014). Реакция на повреждение сетчатки, разобщение межклеточных связей собственно нейральной сетчатки и РПЭ, при существовании сходства в некоторых звеньях клеточных процессов, проявляется в разном регенеративном ответе клеток у разных позвоночных. Разобщение связи РПЭ с сетчаткой и утрата межклеточных связей РПЭ с мембраной Бруха у некоторых хвостатых амфибий, как известно, активирует цепь молекулярных и клеточных событий, приводящих к инициации процесса регенерации и полноценному восстановлению сетчатки (Grigoryan, 2012; Grigoryan, Markitantova, 2016). В основе процесса регенерации сетчатки у этих животных лежит явление трансдифференцировки (естественного репрограммирования) специализированных клеток РПЭ, которое проходит через этапы дедифференцировки клеток, их конверсии в нейробласты, пролиферации и возникновения клеток-предшественников, восполняющих все типы нейронов и глии, присущие полноценной сетчатке (Mitashov, 1996, 1997). У млекопитающих и человека при нарушении связи РПЭ с нейральной сетчаткой происходит активация пролиферации и конверсия клеток РПЭ по пути эпителиально-мезенхимной дифференцировки, что приводит к дегенеративным процессам в нейральной части сетчатки (Kirchhoff, Sorgente, 1989; Chiba, 2014). В этом существенное отличие поведения клеток РПЭ млекопитающих, которое лежит в основе развития патологий сетчатки и РПЭ человека *in vivo*, от естественного репрограммирования клеток РПЭ тритона по нейральному пути дифференцировки, приводящего к полноценному восстановлению сетчатки (Salero et al., 2012; Chiba, 2014). Помимо этого, в отличие от низших позвоночных, для сетчатки млекопитающих типично явление реактивного глиоза, проявляющегося в усиленной пролиферации клеток глии Мюллера и увеличении числа их отростков, как в ответ на повреждение, так и при ряде патологических состояний (Bringmann et al., 2009; de Hoz et al., 2016).

Потенциальными клеточными источниками для регенерации сетчатки у позвоночных могут служить резидентные стволовые/прогениторные клетки или дифференцированные клетки, такие как РПЭ и глия Мюллера (Bi et al., 2009; Barbosa-Sabanero et al., 2012; Ail, Perron, 2017). В первом случае происходит активация пролиферации недифференцированных клеток с их последующей дифференцировкой. Во втором случае, когда источником регенерации служат РПЭ или глия Мюллера, пролиферации предшествует этап дедифференцировки – потеря клетками специализированных внутриклеточных структур и приобретение ими плюрипотентности (Wan et al., 2012; Reichenbach, Bringmann, 2013; Islam et al., 2014; Sifuentes et al., 2016). Дедифференцировка, пролиферация и приобретение плюрипотентности являются ключевыми процессами, обеспечивающими второй этап – инициацию регенерации сетчатки, тогда как успешное ее завершение (третий этап) требует наличия дополнительных факторов, обеспечивающих программирование (в случае стволовых/прогениторных клеток) или ре-

программирование (в случае дифференцированных клеток) пролиферирующих клеток и их дифференцировку с восстановлением нормальной морфологической структуры сетчатки.

В процессе дедифференцировки клеток активно участвуют макрофаги и микроглия, а также задействованы внутриклеточные процессы аутофагии и митофагии. Погибшие клетки высвобождают во внеклеточную среду АТФ и АФК, а макрофаги дополнительно секретируют провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли альфа (TNF-alpha) и интерлейкин IL-1beta. Эти факторы способны стимулировать активность эндогенной микроглии сетчатки. TNF-alpha обеспечивает дальнейшее усиление ОС, запуская экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и НАДФН-оксидазы в микроглие и глие Мюллера (Stevenson et al., 2010). Активированная микроглия сетчатки, в свою очередь, также секретирует провоспалительные цитокины, которые вызывают гибель ганглиозных клеток (Dvoriantchikova, Ivanov, 2014). Предполагается, что в норме в ткани поддерживается равновесие между провоспалительной/прооксидантной и антивоспалительной/антиоксидантной системами, которое нарушается в сторону первой при повреждении ткани (Fischer, Maier, 2015).

На молекулярном уровне прослеживается сходство ответа клеток сетчатки на стресс, возникающий у хвостатых амфибий и млекопитающих при разных типах повреждений, вызванных отслоением сетчатки или повреждением зрительного нерва. Это сходство проявляется в ремоделировании внеклеточного матрикса (Nabeshima et al., 2013; Lenkowski, Raymond, 2014), активации генов воспаления и клеточного стресса (Jarrett, Boulton, 2005; Haynes et al., 2013), усилении экспрессии белков теплового шока (HSPs) (Nagashima et al., 2011), активации протоонкогенов *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* и AP-1 комплекса, вовлеченных в иммунный ответ (Isenmann et al., 2003; Lu et al., 2003; Delyfer et al., 2011; Belin et al., 2015; Mitra et al., 2019). Как у амфибий, так и у млекопитающих, в РПЭ происходит раннее блокирование экспрессии генов-маркеров зрительного цикла (Rpe65, Lrat, Rdh5, Rdh10, Rbp1) под действием провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β (Chiba et al., 2006; Nakazawa et al., 2006; Kang et al., 2018).

Среди сигнальных белков, опосредующих ранний клеточный ответ на повреждение (пролиферация, фенотипические изменения) – продуцируемые клетками сосудистой сети и РПЭ факторы роста FGF2, PEDF и VEGF, соотношение которых важно для нормального функционирования сосудистой сети, регуляции дифференцировки РПЭ, поддержания пролиферации клеток-предшественников при регенерации сетчатки амфибий, а также поддержания дифференцировки клеток РПЭ млекопитающих. У последних, вскоре после отслойки нейральной части сетчатки от РПЭ, также усиливается экспрессия гена FGF2 и соответствующих рецепторов FGFR (Geller et al., 2001; Nakazawa et al., 2006). Известна роль сигнальных путей IGF-1, CNTF и TGFβ в процессе репрограммирования клеток РПЭ у Urodela. IGF-1, как и FGF2, ускоряет пролиферацию и проявление пронейральной дифференцировки в клетках РПЭ (Bringmann et al., 2009). В то же время TGFβ выполняет функцию запрещающего фактора в отношении репрограммирования клеток РПЭ, а также ингибирует пролиферацию РПЭ после отслойки сетчатки у человека (Dieudonne et al., 2004).

Перечисленные регуляторные факторы в большей или меньшей степени зависят от состояния редокс-системы клеток, а, следовательно, чувствительны к ОС. В частности, показано, что в условиях стресса FGF2 перемещается в цитоплазму и ядра клеток, что, по-видимому, обеспечивает их защиту от апоптоза (Kostas et al., 2018). Миграцию белка FGF2 в цитоплазму и ядра клеток наблюдали также на ранних стадиях регенерации сетчатки у хвостатых амфибий *P. waltl* (Маркитантова и др., 2016). В условиях гипоксии и сопутствующего ей ОС секреция клетками РПЭ ангиогенного фактора VEGF-A увеличивается при одновременном снижении секреции ангиогенного ингибитора PEDF, что ведет, в частности, к неоваскуляризации при ВМД (Schlingemann, 2004; Solberg et al., 2013). Перекись водорода индуцирует секрецию TGFbeta в РПЭ и вызывает старение этих клеток (Yu et al., 2009).

Помимо сходства в работе ряда сигнальных путей, действие которых направленно на защиту клетки от стресса, существуют эволюционно закрепленные функциональные различия стратегий клеточных процессов и морфогенеза у отдаленных видов позвоночных, объясняемые различиями в генетических программах регуляции дифференцировки клеток сетчатки на уровне транскриптома, генома, эпигенома и метаболома (см.: Bely, Nyberg, 2010; Cvekl, Mitton, 2010; Fuhrmann, 2010; Solberg et al., 2013; Chung, 2016; Sato et al., 2018; Dvoriantchikova et al., 2019). С помощью технологии Cre-lox показано, что при регенерации сетчатки у взрослого тритона активация фактора транскрипции Pax6 определяет выбор клетками РПЭ нейрального пути дифференцировки с формированием полноценной сетчатки. В то же время, выключение гена Pax6 в РПЭ тритона является причиной нарушений регенерации сетчатки и возникновения структур мезенхимного типа, аналогичных тем, которые наблюдаются при повреждении сетчатки и последующем развитии витреопролиферативной патологии у человека *in vivo* (Casco-Robles, 2016). Существующие различия связаны не только с особенностями регуляции дифференцировки клеток, но, прежде всего, нахо-

дят объяснение в особенностях структурной организации генома у позвоночных (Abdullayev et al., 2013; Nakamura et al., 2014; Bennis et al., 2015; Inami et al., 2016; Elewa et al., 2017; Nowoshilow et al., 2018).

Процесс регенерации регулируется как на локальном (тканевом, внутриклеточном, генетическом), так и на системном (органном, организменном) уровне (Бабаева, 1999; Aurora et al., 2014). Таким образом, в одних случаях (рыбы, амфибии), молекулярно-генетические и клеточные процессы при повреждении или отслойке сетчатки способствуют успешной регенерации, в других (млекопитающие) – ведут к массовой гибели клеток и фиброзному перерождению тканей (Chiba, 2014; Lenkowski, Raymond, 2014). Изучение механизмов эндогенного контроля регенерации сетчатки и регенерационных ответов при ее повреждении и патологиях нейральных тканей глаза у разных позвоночных, а также дальнейшее накопление информации о ключевых регуляторах, звеньях и генах-мишенях в системах регуляции, имеет фундаментальное значение. Понимание механизмов восстановительных процессов в сетчатке способствует развитию оптимальных стратегий прикладного характера применительно к возможностям регенерации этой ткани у человека. Основные направления исследований возможностей регенерации сетчатки позвоночных состоят в поиске экзогенных и эндогенных клеточных источников для восполнения пула клеток и разработке фармакологических препаратов для лечения/восстановления сетчатки, в тех ситуациях, когда это может быть осуществимо. Использование клеточных технологий заключается в попытках экспериментального репрограммирования клеток-источников (малодифференцированных клеток, эмбриональных стволовых, эмбриональных прогениторных клеток сетчатки, индуцированных плюрипотентных (iPS) клеток), получения на их основе органоидов и разработки способов трансплантаций (Chen et al., 2016; DiStefano et al., 2018; Llonch et al., 2018; Singh et al., 2018). Различные экспериментальные подходы к регуляции пролиферации и активации программы нейрогенеза в клетках глии Мюллера основаны на стимуляции пролиферации экзогенными факторами из числа сигнальных белков Wnt, Notch, Hedgehog (Hamon et al., 2016), использовании стратегий редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 или за счет активации внутриклеточных факторов транскрипции (Boda et al., 2017; Campbell, Hyde, 2017). Клетки глии Мюллера сетчатки взрослого человека, также как РПЭ, проявляют свойства латентных нейральных прогениторных клеток и в системе *in vitro* характеризуются активностью факторов транскрипции – маркеров характерных для ретинальных прогениторных клеток PAX6, SOX2, CHX10, NOTCH и белка цитоскелета нестина (Bhatia et al., 2010). Pax6 участвует в процессе нейродегенерации, оказывая прямое влияние на сигнальные пути p53 и TGFbeta и косвенное – на редокс-чувствительные сигнальные пути. Нокаут гена Pax6 приводит к усилению экспрессии антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (Mishra et al., 2015). В качестве факторов, поддерживающих регенерацию, рассматриваются некоторые ростовые факторы, как например, CNTF (Leaver et al., 2006), фактор пигментного эпителия (PEDF) (Vigneswara et al., 2015), фактор роста гепатоцитов (HGF) (Tonges et al., 2011), фактор гипоксии (HIF-1α) (Cho et al., 2015), или их комбинации (Logan et al., 2006). В сетчатке взрослых рыб в ответ на повреждение наблюдается усиление экспрессии ряда факторов роста – CNTF, EGF, FGF, Notch-Delta, WNT (Hamon et al., 2016). Показана возможность активации процесса регенерации сетчатки у эмбрионов кур в результате перепрограммирования клеток РПЭ, под влиянием комплемента C3a, действующего через STAT3 путь. В свою очередь, в ответ на повреждение и воспаление под действием сигналов STAT3 в сетчатке запускается цепь молекулярных событий, включающая возрастание экспрессии генов немедленного реагирования IL-6, IL-8 и Tnf, генов сигнального пути Wnt2b, факторов транскрипции Six3 и Sox2, повышенная активность которых свойственна стволовым и прогениторным клеткам (Haynes et al., 2013). Среди основных факторов, инициирующих пролиферацию и репрограммирование клеток глии Мюллера в нейральном направлении: рассматриваются интерлейкины (IL-6), TNF, металлопротеазы внеклеточного матрикса (MMPs) (Hamon, 2016). В сетчатке мышей, поврежденной в результате действия нейротоксина, удается стимулировать деление клеток глии Мюллера и нейрогенез в результате гиперэкспрессии гена *Ascl1* (Jorstad et al., 2017). Данные о гипометилированном статусе ДНК в нативных высокоспециализированных клетках глии Мюллера рыб свидетельствуют о возможности изменения фенотипа этих клеток под действием внутренних и внешних факторов, а также о роли эпигенетических механизмов перепрограммирования клеток и регенеративных ответов клеток-источников тканей глаза (Powell et al., 2013).

Сигнальные пути FGF2, WNT, Delta-Notch вовлечены в сеть взаимодействий, регулирующих поведение клеток глии Мюллера в зависимости от характера повреждения ткани сетчатки и возраста позвоночных (Das et al., 2006; Lenkowski, Raymond, 2014). Известно действие FGF2 в стимулировании пролиферации и фенотипических изменений клеток глии Мюллера у эмбриона кур (Fischer, Reh, 2002). Активация сигнального пути ретиноевой кислоты стимулирует регенерационные ответы (пластичность и пролиферацию) клеток глии Мюллера и клеток краевой области сетчатки глаза у птиц (Todd et al., 2018). Добавление

ингибитора WNT-рецепторов Frizzled-1 (CRD, богатого цистеином домена) приводит к снятию митогенного эффекта WNT3a на пролиферирующие клетки глии Мюллера в эксплантатах сетчатки взрослой крысы (Osakada et al., 2007). Применение блокатора сигнального пути Notch – DAPT позволяет ингибировать изменения клеточного фенотипа после повреждения сетчатки (Nakamura, Chiba, 2007). При использовании агонистов ретиноевой кислоты в клетках глии Мюллера наблюдается возрастание уровня экспрессии ряда маркерных для малодифференцированных клеток генов транскрипционных факторов (Pax6, Klf4, c-Fos), а при использовании соответствующих антагонистов уровень экспрессии этих генов снижается. В другой работе, на моделе повреждения фоторецепторов сетчатки у рыб *Danio rerio* показано, что снижение уровня в сетчатке gamma-аминомасляной кислоты (ГАМК) – главного тормозного нейромедиатора центральной нервной системы, – с помощью антагониста ГАМКа-рецепторов габазина является одним из пусковых звеньев в инициации пролиферации клеток глии Мюллера (Rao et al., 2017). Дедифференцировка и индукция плюрипотентности клеток глии Мюллера *in vitro* при их инкубации с внеклеточными везикулами, полученными от эмбриональных стволовых клеток, позволяют предполагать возможность их активации для восстановления сетчатки и в условиях *in vivo* (Katsman et al., 2012).

Другая стратегия, заключающаяся главным образом в нейропротекции, основана на активации потенциальных эндогенных механизмов, за счет использования нейротрансмиттеров, их антагонистов, таргеттинга соответствующих рецепторов (Williams, Dexter, 2014). Так, антагонисты пуринэргических P2X рецепторов и агонисты рецепторов аденозина A3R используются в качестве нейропротекторов и регуляторов регенерации сетчатки (Zhang et al., 2006). В основе такого подхода лежит блокирование поступления кальция в клетки (Reichenbach, Bringmann, 2016), поскольку избыток (дисбаланс) внутриклеточного кальция является одной из причин усиленного образования АФК. Стимуляция клеток РПЭ агонистом никотиновых ацетилхолиновых рецепторов активирует пролиферацию глии Мюллера и ее нейральную дифференцировку у взрослых мышей (Webster et al., 2019).

Роль редокс-системы (и в частности, роль АФК) в инициации процесса регенерации сетчатки не охарактеризована, а имеющиеся данные по тканям глаза далеко не полны (Slack et al., 2004; Love et al., 2013). Анализ транскриптома на начальных стадиях регенерации хрусталика у тритона выявил повышение уровня экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию окислительно-восстановительного баланса – *hmox1*, *fam213a*, *irg1*, *serpin-b10* (Sousounis et al., 2013, 2014). На модели повреждения зрительного нерва мыши обнаружено, что введение “перехватчика” свободных радикалов спермидина снижает уровень апоптоза и активность микроглии в зоне повреждения, способствуя поддержанию регенерации нерва (Noro et al., 2015).

Проблемы использования для регенерации сетчатки у млекопитающих, в том числе человека, латентных экзогенных клеток со свойствами “стволовости” все еще далеки от разрешения, что обусловлено, во-первых, сложностью высокоорганизованной структуры сетчатки, во-вторых, устойчивой тенденцией к формированию рубцовой ткани (как, например, в случае пролиферативной витреоретинопатии). Подходы, связанные с трансплантацией клеток и рядом фармакологических воздействий, способны в течение какого-то времени после повреждения сетчатки поддержать жизнеспособность клеток у реципиента, тем самым отсрочив гибель, но не позволяют восстановить структуру сетчатки у взрослых млекопитающих и человека *in vivo* (Llonch et al., 2018; Singh et al., 2018; Gasparini et al., 2019). Существующие стратегии использования фармакологических антиоксидантов при патологиях нейральных тканей направлены на активацию собственного регенеративного потенциала и антиоксидантных систем клеток, поддержание нейрогенеза. Использование эндогенного регенерационного потенциала представляется наиболее перспективным для регенеративной медицины. В связи с этим особого внимания для регенерации и нейропротекции сетчатки позвоночных заслуживают исследования роли эндогенных редокс-систем. В исследованиях этого направления модель совершенной регенерации *de novo* сетчатки у хвостатых амфибий является также одной из наиболее удачных для выяснения роли эндогенных систем ОС и антиоксидантной защиты в активации процессов репрограммирования и поддержания регенерации нейральной ткани.

При наличии видовых особенностей в стратегиях регенерации у разных позвоночных, консерватизм ключевых сигнальных молекул, поддерживающих жизнеспособность клеток и баланс между их гибелью и пролиферацией, а также активирующих репрограммирование клеток-источников, позволяет предполагать общность ключевых звеньев регенерационного ответа. Однако стоит еще раз подчеркнуть существование возможных различий в генетической регуляции сигнальных путей, задействованных в активации/блокировании ответов клеток нейральных тканей глаза на стресс у разных видов позвоночных. Так, показано существование глобальных различий в экспрессии большого числа генов в РПЭ млекопитающих при моделировании ВМД сетчатки и при ее развитии у человека, что обуславливает различия в работе сигнальных путей, вовлеченных в патогенез этого

заболевания (Bennis et al., 2015). Это подчеркивает актуальность сравнительных исследований влияния эндогенных систем ОС и антиоксидантной защиты на процессы репрограммирования клеток-источников, на их поведение и пластичность, на поддержание жизнеспособности и регенерации нейральных тканей глаза у объектов, с неравноценными регенеративными способностями (хвостатые амфибии, млекопитающие). Развитие этого направления будет способствовать выявлению факторов успешной регенерации сетчатки у хвостатых амфибий и использованию полученных данных в разработке эффективных биомедицинских подходов для активации эндогенных регенерационных ресурсов сетчатки у высших позвоночных (млекопитающих).

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Биоразнообразие природных систем” в рамках темы НИР № ИНГЗ 0108-2018-0005 и гранта РФФИ № 16-04-01114.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г., Мартинович И.В. и др. Редокс-гомеостаз биологических систем: теория и практика // Журн. ГрГМУ. 2009. № 2. С. 9–11.

Бабаева А.Г. Репаративные процессы и иммунитет // Изв. АН. Сер. биол. 1999. № 6. С. 261–269.

Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Специфическая активность фактора роста фибробластов 2 и нуклеостемина в формирующейся сетчатке глаза позвоночных // Науч. конф. с международ. участием “Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии” / 6–7 апреля 2016 Москва. Сб. науч. трудов 6–7 апреля 2016. М.: Группа МДВ, 2016. 228 с. С. 107–108.

Abdullayev I., Kirkham M., Bjorklund A.K. et al. A reference transcriptome and inferred proteome for the salamander Notophthalmus viridescens // Exp. Cell Res. 2013. V. 319. № 8. P. 1187–1197.

Ail D., Perron M. Retinal degeneration and regeneration-lessons from fishes and amphibians // Curr. Pathobiol Rep. 2017. V. 5. № 1. P. 67–78.

Akhtar-Schafer I., Wang L., Krohne T.U. et al. Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases // EMBO Mol. Med. 2018. V. 10. № 10. e8259. P. 1–27.

Amano S., Yamagishi S., Inagaki Y. et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes // Microvasc. Res. 2005. V. 69. № 1–2. P. 45–55.

Amram B., Cohen-Tayar Y., David A. et al. The retinal pigmented epithelium – from basic developmental biology research to translational approaches // Int. J. Dev. Biol. 2017. V. 61. № 3-4-5. P. 225–234.

Anders H.J., Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis // J. Am. Soc. Nephrol. 2014. V. 25. № 7. P. 1387–1400.

Atienzar-Aroca S., Flores-Bellver M., Serrano-Heras G. et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells // J. Cell Mol. Med. 2016. V. 20. № 8. P. 1457–1466.

Aurora A.B., Porrello E.R., Tan W., Mahmoud A.I., Hill J.A., Bassel-Duby R., Sadek H.A., Olson E.N. Macrophages are required for neonatal heart regeneration // J. Clin. Invest. 2014. V. 124(3). P. 1382–1392.

Barbosa-Sabanero K., Hoffmann A., Judge C. et al. Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms // Biochem. J. 2012. V. 447. № 3. P. 321–334.

Beatty S., Koh H., Phil M. et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration // Surv. Ophthalmol. 2000. V. 45. № 2. P. 115–134.

Belin S., Nawabi H., Wang C. et al. Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics // Neuron. 2015. V. 86. № 4. P. 1000–1014.

Bely A.E., Nyberg K.G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field // Trends Ecol. Evol. 2010. V. 25. № 3. P. 161–170.

Bennis A., Gorgels T.G., Ten Brink J.B. et al. Comparison of mouse and human retinal pigment epithelium gene expression profiles: potential implications for age-related macular degeneration // PLoS One. 2015. V. 10. № 10. e0141597.

Bhatia B., Singhal S., Jayaram H. et al. Adult retinal stem cells revisited // Open Ophthalmol. J. 2010. V. 4. P. 30–38.

Bi Y.Y., Feng D.F., Pan D.C. Stem/progenitor cells: a potential source of retina-specific cells for retinal repair // Neurosci. Res. 2009. V. 65. № 3. P. 215–221.

Bindoli A., Rigobello M.P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 18. № 13. P. 1557–1593.

Blasiak J., Petrovski G., Vereb Z. et al. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. 768026.

Boda E., Nato G., Buffo A. Emerging pharmacological approaches to promote neurogenesis from endogenous glial cells // Biochem. Pharmacol. 2017. V. 141. P. 23–41.

Borquez D.A., Urrutia P.J., Wilson C. et al. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development // J. Neurochem. 2016. V. 137. № 4. P. 506–517.

Bringmann A., Iandiev I., Pannicke T. et al. Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects // Prog. Retin. Eye Res. 2009. V. 28. № 6. P. 423–451.

Campbell L.J., Hyde D.R. Opportunities for CRISPR/Cas9 gene editing in retinal regeneration research // Front Cell Dev. Biol. 2017. V. 5. Article 99. P. 1–8.

Casco-Robles M.M., Islam M.R., Inami W. et al. Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts // Sci. Rep. 2016. V. 6. 33761.

Chen H.Y., Kaya K.D., Dong L. et al. Three-dimensional retinal organoids from mouse pluripotent stem cells mimic *in vivo* development with enhanced stratification and rod photoreceptor differentiation // Mol. Vis. 2016. V. 22. P. 1077–1094.

Chiba C. The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration // Exp. Eye Res. 2014. V. 123. P. 107–114.

Chiba C., Mitashov V.I. Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // The Strategies for

Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human / Ed. Chiba C. Kerala, India: Res. Signpost., 2007. P. 15–33.

Chiba C., Hoshino A., Nakamura K. et al. Visual cycle protein RPE65 persists in new retinal cells during retinal regeneration of adult newt // J. Comp. Neurol. 2006. V. 495. № 4. P. 391–407.

Cho Y., Shin J.E., Ewan E.E. et al. Activating injury-responsive genes with hypoxia enhances axon regeneration through neuronal HIF-1α // Neuron. 2015. V. 88. № 4. P. 720–734.

Chung J.W. Spot the difference: Solving the puzzle of hidden pictures in the lizard genome for identification of regeneration factors // BMB Rep. 2016. V. 49. № 5. P. 249–254.

Conedera F.M., Pousa A.M.Q., Mercader N. et al. Retinal microglia signaling affects Müller cell behavior in the zebrafish following laser injury induction // Glia. 2019. V. 67. № 6. P. 1150–1166.

Cordeiro J.V., Jacinto A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. № 4. P. 249–262.

Cuenca N., Fernandez-Sanchez L., Campello L. et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases // Prog. Retin. Eye Res. 2014. V. 43. P. 17–75.

Cunha-Vaz J., Bernardes R., Lobo C. Blood-retinal barrier // Eur. J. Ophthalmol. 2011. V. 21. Suppl. 6. P. 3–9.

Cvekl A., Mitton K.P. Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease // Heredity (Edinb). 2010. V. 105. № 1. P. 135–151.

Das A.V., Mallya K.B., Zhao X. et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling // Dev. Biol. 2006. V. 299. № 1. P. 283–302.

de Hoz R., Rojas B., Ramírez A.I. et al. Retinal macroglial responses in health and disease // Biomed. Res. Int. 2016. V. 2016. Article ID 2954721. P. 1–13.

Delyfer M.N., Raffelsberger W., Mercier D. Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death // PLoS One. 2011. V. 6. № 12. e28791.

Diaz-Coranguez M., Ramos C., Antonetti D.A. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development // Vision Res. 2017. V. 139. P. 123–137.

Dieudonne S.C., La Heij E.C., Diederen R. et al. High TGF-beta2 levels during primary retinal detachment may protect against proliferative vitreoretinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. V. 45. № 11. P. 4113–4118.

DiStefano T., Chen H.Y., Panebianco C. et al. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors // Stem Cell Reports. 2018. V. 10. № 1. P. 300–313.

Dvoriantchikova G., Ivanov D. Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF-κB and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways // Eur. J. Neurosci. 2014. V. 40. № 8. P. 3171–3178.

Dvoriantchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D. The epigenetic basis for the impaired ability of adult murine retinal pigment epithelium cells to regenerate retinal tissue // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. 3860. P. 1–13.

Elewa A., Wang H., Talavera-Lopez C. Reading and editing the Pleurodeles waltl genome reveals novel features of tetrapod regeneration // Nat. Commun. 2017. V. 8. № 1. 2286. P. 1–9.

Emanuele S., D'Anneo A., Calvaruso G. et al. The double-edged sword profile of redox signaling: Oxidative events as molecular switches in the balance between cell physiology and cancer // Chem. Res. Toxicol. 2018. V. 31. № 4. P. 201–210.

Erler P., Monaghan J.R. The link between injury-induced stress and regenerative phenomena: A cellular and genetic synopsis // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1849. № 4. P. 454–461.

Ferretti P. Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? // Eur. J. Neurosci. 2011. V. 34. № 6. P. 951–962.

Fischer R., Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF // Oxid. Med. Cell. Longev. 2015. V. 2015. Article ID 610813. P. 1–18.

Fisher S.K., Lewis G.P., Linberg K.A. et al. Cellular remodeling in mammalian retina induced by retinal detachment // Eds. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT, USA, 2007. P. 1–51.

Fischer A.J., Reh T.A. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina // Dev. Biol. 2002. V. 251. № 2. P. 367–379.

Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle // Curr. Top. Dev. Biol. 2010. V. 93. P. 61–84.

Fukui M., Zhu B.T. Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells // Free Radic. Biol. Med. 2010. V. 48. № 6. P. 821–830.

Galliot B., Chera S. The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration // Trends Cell Biol. 2010. V. 20. № 9. P. 514–523.

Galliot B., Crescenzi M., Jacinto A. et al. Trends in tissue repair and regeneration // Development. 2017. V. 144. № 3. P. 357–364.

Galliot B., Ghila L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration // Mol. Reprod. Dev. 2010. V. 77. № 10. P. 837–855.

Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Kepp O. et al. Regulated cell death and adaptive stress responses // Cell. Mol. Life Sci. 2016. V. 73. № 11–12. P. 2405–2410.

Gasparini S.J., Llonch S., Borsch O. et al. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives // Prog. Retin. Eye Res. 2019. V. 69. P. 1–37.

Geller S.F., Lewis G.P., Fisher S.K. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 1363–1369.

Genini S., Beltran W.A., Stein V.M. et al. Isolation and *ex vivo* characterization of the immunophenotype and function of microglia/macrophage populations in normal dog retina // Adv. Exp. Med. Biol. 2014. V. 801. P. 339–345.

Grigoryan E.N. Shared triggering mechanisms of retinal regeneration in lower vertebrates and retinal rescue in higher ones // Tissue Regeneration – From Basic Biol-

ogy to Clinical Application / Ed. Davies J. In Tech. Croatia. 2012. P. 145–164.

Grigoryan E.N., Markitantova Y.V. Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (RPE) natural reprogramming during retinal regeneration in Urodela // Biomedicines. 2016. V. 4. № 4. pii: E28. P. 1–18.

Hameed L.S., Berg D.A., Belnoue L. et al. Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain // Elife. 2015. V. 20. № 4. pii: e08422. P. 1–16.

Haynes T., Luz-Madrigal A., Reis E.S. et al. Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration // Nat. Commun. 2013. V. 4. 2312.

Hamon A., Roger J.E., Yang X.J. et al. Muller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems // Dev. Dyn. 2016. V. 245. № 7. P. 727–738.

Hoon M., Okawa H., Della Santina L. et al. Functional architecture of the retina: development and disease // Prog. Retin. Eye Res. 2014. V. 42. P. 44–84.

Hunter J.J., Morgan J.I., Merigan W.H. et al. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light // Prog. Retin. Eye Res. 2012. V. 31. № 1. P. 28–42.

Inami W., Islam M.R., Nakamura K. et al. Expression of two classes of Pax6 Transcripts in reprogramming retinal pigment epithelium cells of the adult newt // Zoolog Sci. 2016. V. 33. № 1. P. 21–30.

Isenmann S., Kretz A., Cellerino A. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration // Prog. Retin. Eye Res. 2003. V. 22. № 4. P. 483–543.

Islam M.R., Nakamura K., Casco-Robles M.M. et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration // Sci. Rep. 2014. V. 4. 6043. P. 1–8.

Iqbal J., Zhang K., Jin N. et al. Alzheimer's disease is responsible for progressive age-dependent differential expression of various protein cascades in retina of mice // ACS Chem. Neurosci. 2019. Feb. 13. [Epub ahead of print]
https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00710

Jacobs A.T., Marnett L.J. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress // Acc. Chem. Res. 2010. V. 43. № 5. P. 673–683.

Jarrett S.G., Boulton M.E. Antioxidant up-regulation and increased nuclear DNA protection play key roles in adaptation to oxidative stress in epithelial cells // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 38. № 10. P. 1382–1391.

Jorstad N.L., Wilken M.S., Grimes W.N. et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice // Nature. 2017. V. 548. № 7665. P. 103–107.

Kaneko Y., Matsumoto G., Hanyu Y. et al. The occurrence of apoptosis during retinal regeneration in adult newts // Brain Res. Dev. Brain Res. 1999. V. 117. № 2. P. 225–228.

Kang M.K., Lee E.J., Kim Y.H. et al. Chrysin ameliorates malfunction of retinoid visual cycle through blocking activation of AGE-RAGE-ER stress in glucose-stimulated retinal pigment epithelial cells and diabetic eyes // Nutrients. 2018. V. 10. № 8. pii: E1046.

Katsman D., Stackpole E.J., Domin D.R. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles induce gene expression changes in Muller cells of the retina // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e50417.

Keeling E., Lotery A.J., Tumbarello D.A. et al. Impaired cargo clearance in the retinal pigment epithelium (RPE) underlies irreversible blinding diseases // Cells. 2018. V. 7. № 2. pii: E16.

Kimelberg H.K. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view // Neuroscientist. 2010. V. 16. № 1. P. 79–106.

Kirchhof B., Sorgente N. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages // Dev. Ophthalmol. 1989. V. 16. P. 1–53.

Kolb H. Outer Plexiform layer / Eds. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT, USA, 2007a.

Kolb H. Inner Plexiform Layer / Eds. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT, USA, 2007b.

Kolb H. Simple Anatomy of the retina / Eds. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT, USA, 2012.

Kortuem K., Geiger L.K., Levin L.A. Differential susceptibility of retinal ganglion cells to reactive oxygen species // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. V. 41. № 10. P. 3176–3182.

Kostas M., Lampart A., Bober J. et al. Translocation of exogenous FGF1 and FGF2 protects the cell against apoptosis independently of receptor activation // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 21. P. 4087–4101.

Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A. et al. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes // J. Muscle Res. Cell Motil. 2015. V. 36. № 6. P. 377–393.

Kumaramanickavel G. Age-related macular degeneration: Genetics and biology // Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila). 2016. V. 5. № 4. P. 229–235.

Lamb T.D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina // Prog. Retin. Eye Res. 2013. V. 36. P. 52–119.

Langhe R., Chesneau A., Colozza G. et al. Muller glial cell reactivation in *Xenopus* models of retinal degeneration // Glia. 2017. V. 65. № 8. P. 1333–1349.

Leaver S.G., Cui Q., Plant G.W. et al. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells // Gene Ther. 2006. V. 13. № 18. P. 1328–1341.

Lenkowski J.R., Raymond P.A. Muller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish // Prog. Retin. Eye Res. 2014. V. 40. P. 94–123.

Leveillard T., Sahel J.A. Metabolic and redox signaling in the retina // Cell Mol. Life Sci. 2017. V. 74. № 20. P. 3649–3665.

Li F., Huang Q., Chen J. et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration // Sci. Signal. 2010. V. 3. № 110. ra13. P. 1–20.

Llonch S., Carido M., Ader M. Organoid technology for retinal repair // Dev. Biol. 2018. V. 433. № 2. P. 132–143.

Logan A., Ahmed Z., Baird A. et al. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury // Brain. 2006. V. 129. Pt 2. P. 490–502.

Love N.R., Chen Y., Ishibashi S. et al. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration // Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. № 2. P. 222–228.

Lu Q., Cui Q., Yip H.K. et al. c-Jun expression in surviving and regenerating retinal ganglion cells: effects of intravitreal neurotrophic supply // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. V. 44. № 12. P. 5342–5348.

Lushchak V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2011. V. 153. № 2. P. 175–190.

Ma W., Zhang Y., Gao C. et al. Monocyte infiltration and proliferation reestablish myeloid cell homeostasis in the mouse retina following retinal pigment epithelial cell injury // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. 8433. P. 1–18.

Masutomi K., Chen C., Nakatani K. et al. All-trans retinal mediates light-induced oxidation in single living rod photoreceptors // Photochem. Photobiol. 2012. V. 88. № 6. P. 1356–1361.

Mazzolini M., Facchetti G., Andolfi L. et al. The phototransduction machinery in the rod outer segment has a strong efficacy gradient // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 20. E2715-24.

Meda F., Rampon C., Dupont E. et al. Nerves, H_2O_2 and Shh: Three players in the game of regeneration // Semin. Cell Dev. Biol. 2018. V. 80. P. 65–73.

Mishra S., Maurya Sh.K., Srivastava K., Shukla S., Mishra R. Pax6 influences expression patterns of genes involved in neuro-degeneration // Ann. Neurosci. 2015. V. 22. № 4. P. 226–231.
https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.220407

Mitashov V.I. Mechanisms of retina regeneration in urodeles // Int. J. Dev. Biol. 1996. V. 40. № 4. P. 833–844.

Mitashov V.I. Retinal regeneration in amphibians // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. № 6. P. 893–905.

Mitchell C.H., Lu W., Hu H. et al. The P2X(7) receptor in retinal ganglion cells: A neuronal model of pressure-induced damage and protection by a shifting purinergic balance // Purinergic Signal. 2008. V. 4. № 4. P. 313–321.

Mitra S., Sharma P., Kaur S. et al. Dual regulation of lin28a by Myc is necessary during zebrafish retina regeneration // J. Cell Biol. 2019. V. 218. № 2. P. 489–507.

Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B. et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications // Free Radic. Res. 2018. V. 52. № 5. P. 507–543.

Murawala P., Tanaka E.M., Currie J.D. Regeneration: the ultimate example of wound healing // Semin. Cell Dev. Biol. 2012. V. 23. № 9. P. 954–962.

Nabeshima A., Nishibayashi C., Ueda Y. et al. Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by Rax and Pax6 activation // Genesis. 2013. V. 51. № 6. P. 410–419.

Nagashima M., Fujikawa C., Mawatari K. et al. HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: its role in cell survival // Neurochem. Int. 2011. V. 58. № 8. P. 888–895.

Nakamura K., Chiba C. Evidence for Notch signaling involvement in retinal regeneration of adult newt // Brain Res. 2007. V. 1136. № 1. P. 28–42.

Nakamura K., Islam M.R., Takayanagi M. et al. A transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt, Cynops pyrrhogaster // PLoS One. 2014. V. 9. № 10. e109831. P. 1–12.

Nakanishi T., Shimazawa M., Sugitani S. et al. Role of endoplasmic reticulum stress in light-induced photoreceptor degeneration in mice // J. Neurochem. 2013. V. 125. № 1. P. 111–124.

Nakanishi-Ueda T., Majima H.J., Watanabe K. et al. Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells // Free Radic. Res. 2013. V. 47. № 10. P. 774–780.

Nakazawa T., Matsubara A., Noda K. et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats // Mol. Vis. 2006. V. 12. P. 867–878.

Neves J., Zhu J., Sousa-Victor P. et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina // Science. 2016. V. 353. № 6294. aaf3646.

Newman E.A. Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci. 2015. V. 370 (1672).

Noro T., Namekata K., Kimura A. et al. Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury // Cell Death Dis. 2015. V. 6. e1720.

Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F. et al. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators // Nature. 2018. V. 554. № 7690. P. 50–55.

Osakada F., Ooto S., Akagi T. et al. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 15. P. 4210–4219.

Perez-Torres I., Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz M.E. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 10. pii: E2098. P. 1–26.

Powell C., Grant A.R., Cornblath E. et al. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 49. P. 19814–19819.

Rao M.B., Didiano D., Patton J.G. Neurotransmitter-regulated regeneration in the zebrafish retina // Stem Cell Reports. 2017. V. 8. № 4. P. 831–842.

Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. 2012. V. 24. № 5. P. 981–990.

Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction // Curr. Opin. Cell Biol. 2015. V. 33. P. 8–13.

Reichenbach A., Bringmann A. Role of purines in Müller glia // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2016. V. 32. № 8. P. 518–533.

Reichenbach A., Bringmann A. New functions of Muller cells // Glia. 2013. V. 61. № 5. P. 651–678.

Roehlecke C., Schumann U., Ader M. et al. Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation // PLoS One. 2013. V. 8. № 9. e71570. P. 1–12.

Roy S., Levesque M. Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? // Sci. World J. 2006. V. 6. Suppl. 1. P. 12–25.

Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. № 1. P. 88–95.

Sanes J.R., Masland R.H. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification // Annu. Rev. Neurosci. 2015. V. 38. P. 221–246.

Sato K., Saigusa D., Saito R. et al. Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. 11930.

Schlingemann R.O. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2004. V. 242. № 1. V. 91–101.

Seagle B.L., Rezai K.A., Gasyna E.M. et al. Time-resolved detection of melanin free radicals quenching reactive oxygen species // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. № 32. P. 11220–11221.

Selvam S., Kumar T., Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease // Prog. Retin. Eye Res. 2018. V. 63. P. 1–19.

Sharma T.P., McDowell C.M., Liu Y. et al. Optic nerve crush induces spatial and temporal gene expression patterns in retina and optic nerve of BALB/cJ mice // Mol. Neurodegener. 2014. V. 9. № 14. P. 1–19.

Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 715–748.

Sifuentes C.J., Kim J.W., Swaroop A. et al. Rapid, dynamic activation of Müller glial stem cell responses in zebrafish // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 13. P. 5148–5160.

Simo R., Hernandez C. European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR) Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives // Trends Endocrinol. Metabol. 2014. V. 25. № 1. P. 23–33.

Simon M.V., Agnolazza D.L., German O.L. et al. Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress // J. Neurochem. 2016. V. 136. № 5. P. 931–946.

Singh R., Cuzzani O., Binette F. et al. Pluripotent stem cells for retinal tissue engineering: Current status and future prospects // Stem Cell Rev. 2018. V. 14. № 4. P. 463–483.

Slack J.M., Beck C.W., Gargioli C. et al. Cellular and molecular mechanisms of regeneration in *Xenopus* // Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 2004. V. 359. № 1445. P. 745–751.

Solberg R., Escobar J., Arduini A. et al. Metabolomic analysis of the effect of postnatal hypoxia on the retina in a newly born piglet model // PLoS One. 2013. V. 8. № 6. e66540.

Sousounis K., Bhavsar R., Looso M. et al. Molecular signatures that correlate with induction of lens regeneration in newts: lessons from proteomic analysis // Hum. Genomics. 2014. V. 8. 22. P. 1–16.

Sousounis K., Looso M., Maki N. et al. Transcriptome analysis of newt lens regeneration reveals distinct gradients in gene expression patterns // PLoS One. 2013. № 4. P. 8. e61445.

Stevenson L., Matesanz N., Colhoun L. et al. Reduced nitro-oxidative stress and neural cell death suggests a protective role for microglial cells in TNFalpha–/– mice in ischemic retinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. № 6. P. 3291–3299.

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // Physiol. Rev. 2005. V. 85. № 3. P. 845–881.

Subirada P.V., Paz M.C., Ridano M.E. et al. A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death // Eur. J. Neurosci. 2018. V. 47. № 12. P. 1429–1443.

Sun M., Finnemann S.C., Febbraio M. et al. Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 7. P. 4222–4230.

Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants // Free Radic. Biol. Med. 2012. V. 53. № 12. P. 2269–2276.

Tate D.J., Jr., Miceli M.V., Newsome D.A. Phagocytosis and H_2O_2 induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. V. 36. № 7. P. 1271–1279.

Todd L., Suarez L., Quinn C. et al. Retinoic acid-signaling regulates the proliferative and neurogenic capacity of muller glia-derived progenitor cells in the avian retina // Stem Cells. 2018. V. 36. № 3. P. 392–405.

Tokarz P., Kaarniranta K., Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) // Biogerontology. 2013. V. 14. № 5. P. 461–482.

Tonges L., Ostendorf T., Lamballe F. et al. Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration *in vitro* and *in vivo* // J. Neurochem. 2011. V. 117. № 5. P. 892–903.

Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A. et al. Redox regulation of cell survival // Antioxid. Redox Signal. 2008. V. 10. № 8. P. 1343–1374.

Trost A., Bruckner D., Rivera F.J. et al. Pericytes in the retina // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1122. P. 1–26.

Tsukamoto Y. Morphological survey from neurons to circuits of the mouse retina // Meth. Mol. Biol. 2018. V. 1753. P. 3–25.

Ueta T., Inoue T., Furukawa T. et al. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 10. P. 7675–7682.

Usui S., Oveson B.C., Iwase T. et al. Overexpression of SOD in retina: need for increase in H_2O_2-detoxifying enzyme in same cellular compartment // Free Radic. Biol. Med. 2011. V. 51. № 7. P. 1347–1354.

van der Vliet A., Janssen-Heininger Y.M. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? // J. Cell. Biochem. 2014. V. 115. № 3. P. 427–435.

Vigneswara V., Esmaeili M., Deer L. et al. Eye drop delivery of pigment epithelium-derived factor-34 promotes retinal ganglion cell neuroprotection and axon regeneration // Mol. Cell. Neurosci. 2015. V. 68. P. 212–221.

Vriz S., Reiter S., Galliot B. Cell death: a program to regenerate // Curr. Top. Dev. Biol. 2014. V. 108. P. 121–151.

Wan J., Goldman D. Retina regeneration in zebrafish // Curr. Opin. Genet. Dev. 2016. V. 40. P. 41–47.

Wan J., Ramachandran R., Goldman D. HB-EGF is necessary and sufficient for Muller glia dedifferentiation and

retina regeneration // Dev. Cell. 2012. V. 22. № 2. P. 334–347.

Wang Z., Dillon J., Gaillard E.R. Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. № 2. P. 474–479.

Wang S., Chu C.H., Stewart T. et al. α-Synuclein, a chemoattractant, directs microglial migration via H_2O_2-dependent Lyn phosphorylation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 15. E1926–1935.

Webster M.K., Barnett B.J., Stanchfield M.L. et al. Stimulation of retinal pigment epithelium with an α7 nAChR agonist leads to Müller glia dependent neurogenesis in the adult mammalian retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2019. V. 60. № 2. P. 570–579.

Werdich X.Q., Place E.M., Pierce E.A. Systemic diseases associated with retinal dystrophies // Semin. Ophthalmol. 2014. V. 29. № 5–6. P. 319–328.

Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 18. № 6. P. 642–660.

Williams C.J., Dexter D.T. Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease // J. Neurochem. 2014. V. 129. № 1. P. 4–20.

Yu A.L., Fuchshofer R., Kook D. et al. Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via TGF-beta release // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. V. 50. № 2. P. 926–935.

Zacks D.N. Gene transcription profile of the detached retina (An AOS Thesis) // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 2009. V. 107. P. 343–382.

Zacks D.N., Han Y., Zeng Y. et al. Activation of signaling pathways and stress-response genes in an experimental model of retinal detachment // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. V. 47. № 4. P. 1691–1695.

Zareba M., Sarna T., Szewczyk G. Photobleaching of melanosomes from retinal pigment epithelium: II. Effects on the response of living cells to photic stress // Photochem. Photobiol. 2007. V. 83. № 4. P. 925–930.

Zhang X., Zhang M., Laties A.M. et al. Balance of purines may determine life or death of retinal ganglion cells as A3 adenosine receptors prevent loss following P2X7 receptor stimulation // J. Neurochem. 2006. V. 98. № 2. P. 566–575.

Zhang S.X., Sanders E., Fliesler S.J. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration // Exp. Eye. Res. 2014. V. 125. P. 30–40.

Zhao X.F., Wan J., Powell C. et al. Leptin and IL-6 family cytokines synergize to stimulate Müller glia reprogramming and retina regeneration // Cell Rep. 2014. V. 9. № 1. P. 272–284.

Zhao L., Zabel M.K., Wang X. et al. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration // EMBO Mol. Med. 2015. V. 7. № 9. P. 1179–1197.

Zhou G., Meng S., Li Y. et al. Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming // Cell Rep. 2016. V. 15. № 5. P. 919–925.

The Role of the Redox System in Initiation of Neural Eye Tissues Regenerative Response in Vertebrates

Yu. V. Markitantova[1, *] and V. N. Simirskii[1]

[1]*Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: yuliya.mark@gmail.com*

Received May 29, 2019; revised July 5, 2019; accepted July 16, 2019

The review examines the role of oxidative stress (OS) in the primary cell response of the neural eye tissues to damage and degenerative processes. The shift of the redox balance (homeostasis) in the direction of oxidative processes is the basis of OS. OS may be used as a part of the protective mechanism that initiates the processes of healing and regeneration of damaged tissues. Disruption of the redox homeostasis and development of OS trigger an inflammatory and immune responses in the retina. Release of ATP, calcium ions and reactive oxygen species (ROS) into the extracellular space, attraction of exogenous immune cells, activation of endogenous macro- and microglia, apoptosis of neurons are the main universal and conservative stress reactions in all vertebrates. However, with the similarity of some elements of cellular and molecular processes there are evolutionarily stable functional differences in the regenerative response of retinal cells, and the final result is not equivalent in different species of vertebrates. It is determines the choice of the regeneration strategies: activation of endogenous stem/progenitor cells and/or reprogramming of differentiated cells (retinal pigment epithelium, Müller glia). The identification of the key signaling pathways involved in OS realization of regenerative responses of the damaged or pathological neural tissues contributes to the selection of optimal strategies for cell and/or gene therapy to activate the endogenous regenerative potential of the neural retina in human.

Keywords: redox homeostasis, oxidative stress, reactive oxygen species, retina regeneration in vertebrates, endogenous stem/progenitor cells, strategies of regeneration

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 35–50

ОБЗОРЫ

УДК 57.085.23

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Ю. П. Новикова[a], *, В. А. Поплинская[a], Э. Н. Григорян[a], **

[a]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: info@idbras.ru

**e-mail: leonore@mail.ru

Поступила в редакцию 12.02.2019 г.
После доработки 17.06.2019 г.
Принята к публикации 30.06.2019 г.

В обзоре, с использованием литературных и собственных данных, приведена информация о проведенных в разное время экспериментах с применением органотипического культивирования сетчатки позвоночных животных и человека. Метод позволяет сохранять структуру и жизнеспособность сетчатки, моделировать ряд ее патологических состояний, наблюдать за процессами развития, регенерации и реконструкции, гибелью и ростом отростков нейронов. Помимо этого, органотипическое культивирование дает возможность воздействовать на все указанные процессы различными регулирующими факторами, а также защитными/повреждающими агентами в строго заданных концентрациях и при контролируемых условиях. Особое внимание уделено поведению клеток ретинального пигментного эпителия, фоторецепторных клеток, глиальных клеток Мюллера, ганглиозных клеток и их аксонов, то есть тем клеточным популяциям, которые чаще всего затрагиваются в случаях различных патологических состояний и заболеваний сетчатки. Отдельный раздел посвящен активно развиваемым сегодня производству и культивированию так называемых органоидов сетчатки. Направление сулит возможности для трансплантации клеток сетчатки, проведения экспериментов по генотерапии, а также тестированию офтальмологических фармакологических препаратов.

Ключевые слова: позвоночные, сетчатка, культивирование, регенерация, реконструкция, органоиды

DOI: 10.31857/S0475145020010061

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные культуры *in vitro* являются важным инструментом в исследованиях отдельно взятых клеточных популяций в условиях их изоляции, и существенным дополнением к экспериментам, проводимым *in vivo*. Клеточные культуры позволяют изучать жизнеспособность, морфологию, поведение, функцию клеток и их популяций, а также влияние на эти процессы различных субстанций, обладающих токсическим, защитным или регуляторным действием. Помимо этого, клеточное культивирование – незаменимый инструмент в изучении молекулярных факторов регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, изменений или конверсий клеточного фенотипа. Ну и, наконец, культивирование клеток *in vitro* – инструмент производства и накопления популяций стволовых или малодифференцированных клеток для самых различных нужд современной биомедицины.

Несмотря на все преимущества клеточного культивирования, изолированные, высаженные *in vitro* клетки, лишены привычного окружения и влияний со стороны прилежащих тканей. Это, как известно, является определенным препятствием для экстраполяции получаемых сведений на ситуацию *in situ*. В этой связи в последние два десятилетия большое внимание уделяется органотипическому культивированию, являющемуся более адекватным для симуляции условий целого организма, поэтому часто в литературе эта технология расценивается как "*in vivo*-like *in vitro* technology" (Schutgens et al., 2016), а культивируемая ткань как "*in vivo*-like *in vitro* model" (Cho et al., 2018). В значительной степени это касается нейральной ткани, при изучении которой очень важно сохранение существующей исходно сложной структурной и синаптической организации (Humpel, 2015).

Сетчатка глаза позвоночных животных является сложным сенсорным органом, в обеспечении функции которого принимают участие различные типы нейронов, глиальные клетки, а также ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) (Hoon et al., 2014). Основные типы клеток сетчатки имеют широкий ряд подтипов, организован-

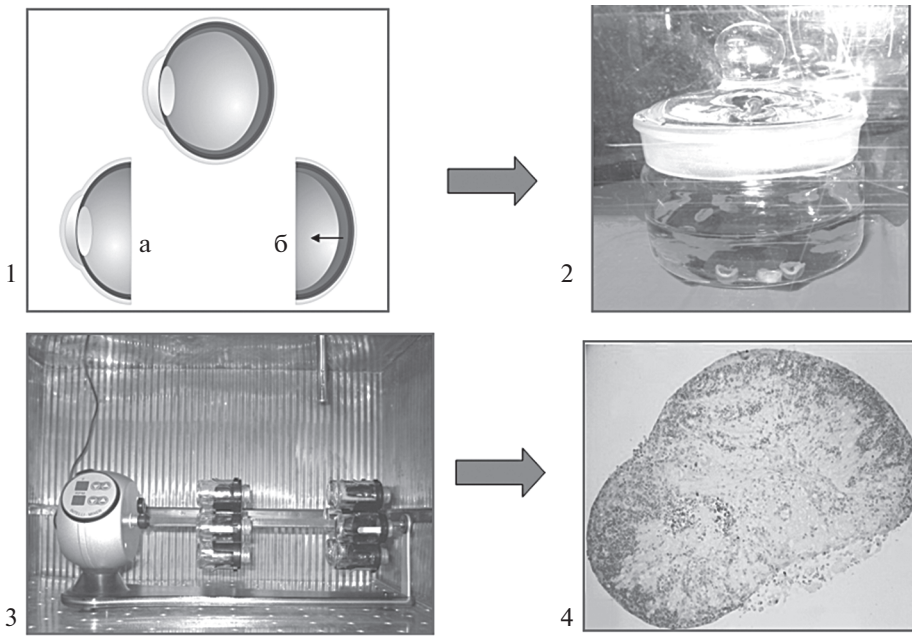

Рис. 1. Этапы органотипического ротационного культивирования сетчатки глаза. 1 – микрохирургическое выделение сетчатки: а – изоляция переднего сектора глаза, б – сетчатка в составе задней стенки глаза и ее изоляция (стрелка); 2 – помещение образцов в холодную среду культивирования; 3 – экспозиция изолированных сетчаток в среде при постоянном вращении; 4 – замкнутая сфера сетчатки крысы по окончании экспозиции.

ных в сложный, формирующийся в развитии клеточный ансамбль, где взаимодействие осуществляется благодаря большому числу нейральных и межклеточных связей (Amini et al., 2018). Это обстоятельство требует от исследователей использования в работе ткани сетчатки целиком (“wholemount”), без клеточного разобщения и разрушения ее нативной структуры. Этому условию соответствует органотипическое культивирование сетчатки, привлекающее в настоящее время большое внимание.

МЕТОД ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

Термин “органотипический” впервые был использован в 1954 г. при описании дифференцировки развивающейся сетчатки глаза цыпленка *in vitro* (Reinbold, 1954). В ходе развития метода помимо стационарной культуры целой сетчатки или ее срезов стали использовать технику ротационного органотипического культивирования во вращающихся трубках или культуральных флаконах (Gähwiler, 1988; Braschler et al., 1989; Gähwiler et al., 1997, 2001; Victorov et al., 2001). Такой способ, благодаря перманентному поступлению при вращении свежей порции среды к ткани, обеспечивал большую ее сохранность, а также увеличение сроков культивирования (рис. 1).

Органотипическое культивирование является незаменимым инструментом в исследованиях механизмов развития, регенерации сетчатки и составляющих их процессов – клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки, а также морфогенеза (Amini et al., 2018). В ходе исследований оказалось возможным культивировать целиком глазные бокалы 2–5-ти дневных куриных и перепелиных эмбрионов в течение двух суток (Halfter, Deiss, 1986). На протяжении шести суток культивировали сетчатки 5–6-ти дневных эмбрионов кур вместе с РПЭ и без него (Liu et al., 1988). Сетчатку неонатальных кроликов культивировали на протяжении двух недель (Germer et al., 1997; Pinzon-Duarte et al., 2000), а эксплантаты сетчатки неонатальных мышей, помещенные в бессывороточную среду – четыре недели (Caffe et al., 1993; Ogilvie et al., 1999). Часто применяли культивирование радиальных срезов сетчатки различной толщины, полученных как от высших, так и низших позвоночных животных (Mack, Fernald, 1991; Feigenspan et al., 1993; Sassoe-Pognetto et al., 1996).

Сегодня органотипическое культивирование сетчатки wholemount широко используется для самых различных целей, в том числе для морфологических, биохимических и фармакологических исследований этой ткани (см. обзор Li et al., 2018). Условия органотипического культивирования применяют для проведения генно-инженерных манипуляций (Moritoh et al., 2010), в частности переноса генов, способных транзитно экспрессироваться в клетках культивируемой сетчатки

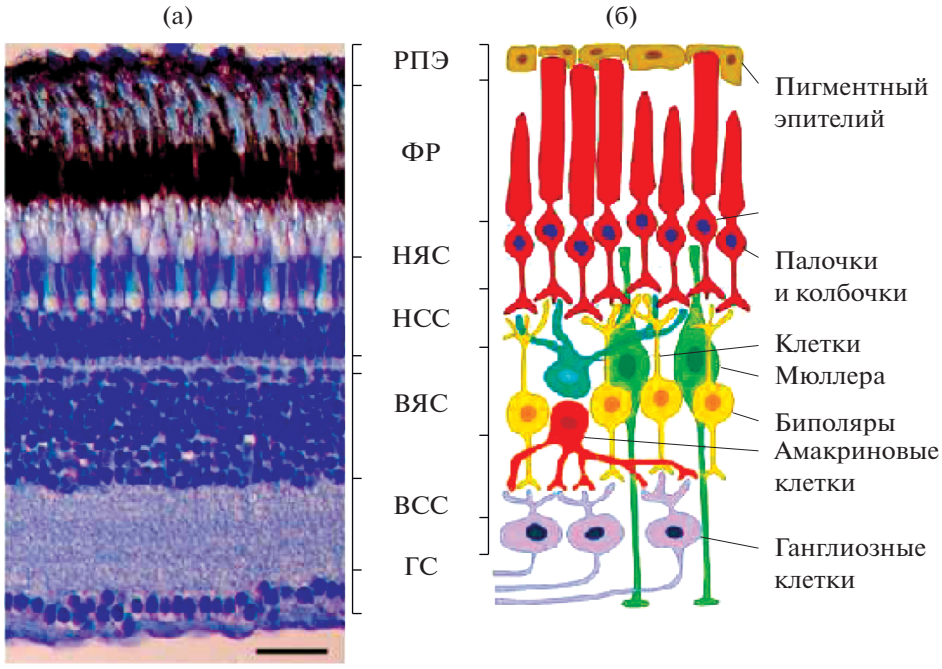

Рис. 2. Строение сетчатки на гистологическом срезе (а) и в схематическом изображении основных клеточных типов (б). Из: Gramage, Hitchcock, 2014 (с модификациями).

(Moritoh et al., 2013). И, наконец, органотипическое культивирование позволяет проводить многочисленные фармакологические испытания, в ходе которых можно строго контролировать условия тестирования препаратов, обладающих протекторным, либо токсическим эффектом.

Здесь следует напомнить, что офтальмологические препараты чаще всего тестируются *in vivo* на кроликах, кошках, собаках, свиньях и обезьянах (Shafaie et al., 2016). Органотипические культуры являются незаменимой альтернативой этим экспериментам, экономичны в отношении объемов тестируемых веществ, позволяют значительно снизить число используемых в эксперименте животных. В экспериментах на сетчатке позвоночных удалось выявить эффективность различных факторов в увеличении жизнеспособности и снижении риска повреждения нейронов. Среди таких веществ отмечены ростовые факторы, нейротрофины, цитокины (LaVail et al., 1998), белки клеточной адгезии (Rattner et al., 2001), а также антиокисиданты (Grigoryan et al., 2012).

Как указано выше, во многих работах на сетчатке позвоночных был использован материал, полученный от развивающихся животных, формирование сетчатки глаза у которых еще не завершено. В экспериментах, проведенных с помощью органотипического ротационного культивирования, мы использовали изолированную сетчатку wholemount взрослых животных, с целью изучения ее способности к регенерации и/или реконструкции (Новикова и др., 2010; Grigoryan et al., 2016), а также факторов, потенциально способных увеличивать клеточную жизнеспособность (Новикова, 2010; Grigoryan et al., 2012, 2013).

СТРОЕНИЕ СЕТЧАТКИ И КЛЕТКИ ИСТОЧНИКИ ЕЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

В контексте данной статьи необходимо коротко остановится на строении сетчатки глаза. Сетчатка является частью ЦНС, обеспечивает получение, обработку зрительной информации и передачу ее в соответствующую область мозга (Dowling, 2012). Для выполнения подобных функций сетчатка высоко организована. У позвоночных она инвертирована: свет должен пройти через все слои сетчатки для того чтобы достичь фоторецепторов – основных акцепторов света. В эволюционном ряду позвоночных животных сетчатка имеет общий и универсальный план строения. Схематично послойная организация сетчатки выглядит следующим образом (рис. 2). Снаружи она выстлана слоем пигментированных эпителиальных клеток – РПЭ, взаимодействующих с фоторецепторами сетчатки и обеспечивающих совместно с ними восприятие света и его обработку для передачи по зрительному каскаду. Каскад, в свою очередь, обеспечивается клетками ядерных (наружный и внутренний, НЯС и ВЯС) и сетчатых (наружный и внутренний, НСС и ВСС) слоев, а также ганглиозными клетками, отсылающими свои отростки (аксоны) в зрительный нерв. НЯС представлен тела-

ми фоторецепторных клеток, а ВЯС – телами интернейронов – биполярами и амакриновыми клетками, а также рядом горизонтальных клеток. НСС содержит отростки фоторецепторов, взаимодействующие с отростками интернейронов, а ВЯС состоит из отростков интернейронов во взаимодействии с отростками ганглиозных клеток.

Мюллеровская глия является единственной популяцией макроглиальных клеток в составе сетчатки. Клетки Мюллера пронизывают толщу сетчатки, обеспечивают механическую ее поддержку, посылая свои длинные отростки наружу и вовнутрь, участвуют в формировании наружной и внутренней пограничных мембран сетчатки (MacDonald et al., 2015). Помимо этого, клетки Мюллера обеспечивают трофическую поддержку всех без исключения ретинальных нейронов (Reichenbach, Bringmann, 2013) и служат световосприятию (Franze et al., 2007).

Отдельно необходимо остановиться на клетках – источниках восстановления сетчатки. Вопрос – существенный в аспекте наших исследований с использованием органотипического культивирования, однако слишком широкий для подробного изложения в данной статье. Спектр эндогенных клеток источников восстановления сетчатки описан в литературе последних лет (Jeon, Oh, 2015; Chohan et al., 2017; Григорян, 2018, 2019). В сетчатке глаза к категории клеток, которые в зависимости от вида и возраста животных потенциально могут или реально участвуют в восстановлении сетчатки, относят клетки цилиарной области глаза. У низших позвоночных животных это – цилиарная маргинальная зона – ЦМЗ, а у высших – область края сетчатки и цилиарного тела. Помимо этого, регенерационный ресурс представляют РПЭ и клетки Мюллера. Последние расцениваются как наиболее перспективные для регенерации сетчатки высших позвоночных и человека (см. обзор: Григорян, 2019). Еще одним важным механизмом восстановления сетчатки является рост нейральных отростков и восстановление синаптических связей между различными типами нейронов в поврежденной сетчатке. Изучению этого механизма также значительно способствует метод органотипического культивирования сетчатки (Al-Ali et al., 2017).

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

В исследованиях, применявших органотипическое культивирование сетчаток низших позвоночных, в качестве объектов использовали рыб, хвостатых и бесхвостых амфибий. Работ таких немного, что, по-видимому, обусловлено легкой доступностью этих животных для исследований *in vivo*. Тем не менее, как мы увидим ниже, и они вносят свой существенный вклад в изучение восстановительных возможностей сетчатки.

Культивирование срезов сетчатки взрослых костистых рыб в течение 5 дней позволило обнаружить, что *in vitro* сохраняются не только основные морфологические свойства ткани, в частности стратификация, но и присущие нормальной сетчатке основные, выявляемые иммунохимически, клеточные типы. Более того, были обнаружены признаки регенерации сетчатки – рост клеток ЦМЗ с периферии, а также пополнение фоторецепторного слоя за счет клеток предшественников, локализующихся во ВЯС. Динамика пролиферации клеток ЦМЗ по результатам тимидиновой радиоавтографии оказалась сходной с наблюдаемой *in vivo*, также, как и появление в НЯС имеющих фоторецепторный иммунофенотип новых клеток. Они были потомками клеточного источника, локализующегося в ВЯС (Mack, Fernald, 1991, 1992). Позже, органотипическое культивирование изолированной сетчатки рыб *Danio rerio* позволило изучить некоторые детали восстановления сетчатки за счет глиальных клеток Мюллера (Lahne et al., 2017). Регенерация поврежденной ярким светом сетчатки происходила благодаря входу клеток Мюллера в клеточный цикл, производству ими клеток-потомков и их последующей дифференцировке в утерянные при облучении светом фоторецепторы. При этом имела место интеркинетическая миграция клеток-потомков Мюллеровских клеток из ВЯС в НЯС. Проследить за этим интересным процессом, являющимся важным, но до последнего времени малопонятным этапом регенерации, удалось благодаря предварительному мечению клеток флуоресцентной меткой (Tg[gfap:nGFP]), а также использованию мультифотонной прижизненной микроскопии. В этом же эксперименте на основании полученных данных прижизненной регистрации миграции клеток Мюллера была оценена динамика их движения вдоль наружной и внутренней ограничивающих мембран сетчатки (Lahne et al., 2017). На эксплантатах сетчатки золотой рыбки (*Carassius auratus*), находящихся *in vitro* в течение 5 сут, протестировано действие на рост аксонов ганглиозных клеток таурина и серотонина. Отметим, что рост аксонов – один из важных, постоянно исследуемых механизмов восстановления сетчатки. Результаты показали увеличение скорости процесса при добавлении таурина и снижение в присутствии в среде культивирования серотонина (Matus et al., 1997).

Примеров органотипического культивирования сетчатки бесхвостых амфибий немного. При использовании в культуре сетчатки шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, удалось установить, что после разобщения нейральной сетчатки и РПЭ в течение 3 часов происходит возвращение утраченных при выделении ткани взаимодействий фоторецепторных и клеток РПЭ. Это происходи-

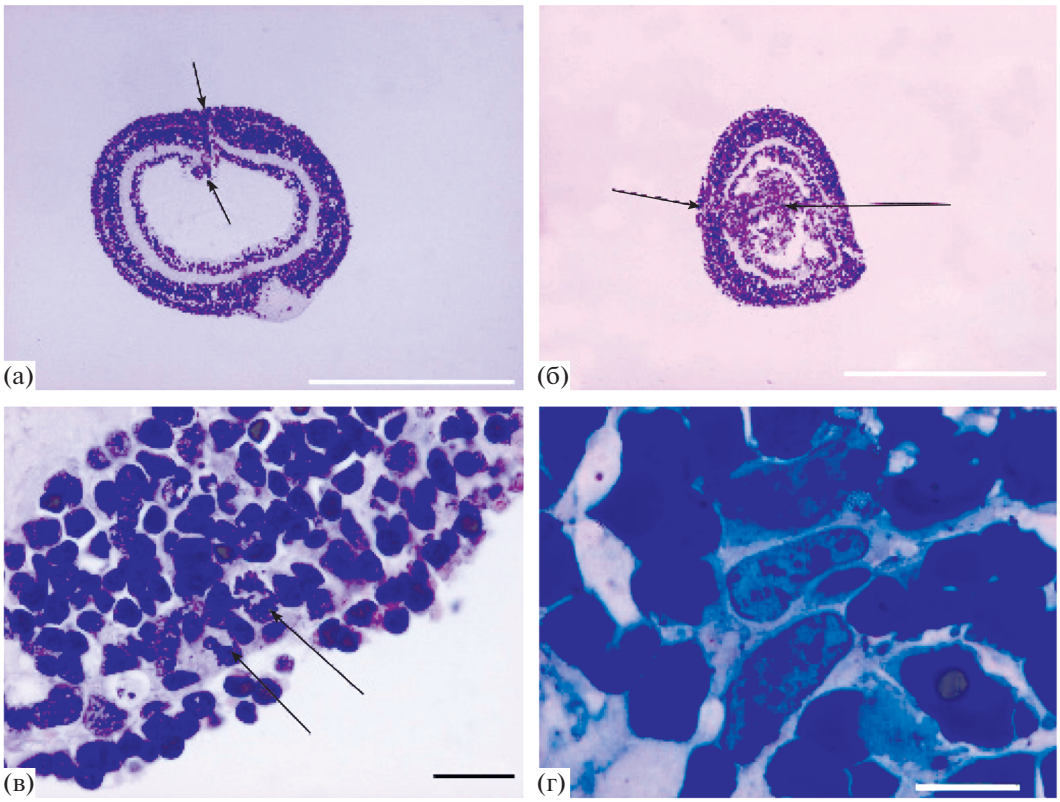

Рис. 3. Сетчатка тритона, экспонированная в условиях ротационного органотипического культивирования. Общий вид через две (а) и четыре (б) недели культивирования. Стрелки указывают на область смыкания сфероида и область выхода зрительного нерва (а), масштабный отрезок: 500 мкм; в – митозы во внутреннем ядерном слое сетчатки (стрелки), масштабный отрезок – 20 мкм; г – клетки, имеющие фенотип нейробластов, среди исходных нейронов внутренней части сетчатки (стрелки), масштабный отрезок – 10 мкм.

ло благодаря быстрому восстановлению, имеющих место *in situ* нативных свойств РПЭ, в частности адгезивных, ключевых при взаимодействии апикальных отростков РПЭ с наружными сегментами фоторецепторов (Defoe, Easterling, 1994). Органотипическое культивирование сетчатки *Xenopus laevis* в составе задней стенки глаза, т.е. вместе с подстилающими сетчатку РПЭ, хороидальной и склеральной оболочками, позволило подтвердить пригодность этой модели для анализа процесса восстановления взаимодействия клеток РПЭ и фоторецепторов. В результате были оценены не только жизнеспособность клеток наружной сетчатки, но и поведение белков светотрансдукции аррестина и трансдуцина (Reidel et al., 2006).

Мы проводили органотипическое роллерное культивирование сетчатки тритона *Pleurodeles waltl* (Urodela) (Новикова и др., 2010). Исследование было направлено на выяснение способов регенерации и участие в ней внутренних источников сетчатки у этих животных в отсутствие РПЭ. Последний при этом хорошо известен как основной источник клеток сетчатки для восстановления у тритонов после ее удаления, перерезки зрительного нерва и отслойки сетчатки *in vivo* (Keefe, 1973; Mitashov, 1996, 1997, Grigoryan, 2012). Оказалось, что выбранные условия длительного культивирования (в пределах одного месяца) индуцируют активацию, пролиферацию и миграцию клеток – внутренних источников регенерации нейральной сетчатки, а также рост нейральных отростков жизнеспособных нейронов. Поскольку сетчатку выделяли без РПЭ, восстановление могло происходить только за счет собственного клеточного ресурса нейральной сетчатки – клеток ЦМЗ, биполяро-подобных клеток и, возможно, клеток Мюллера (Григорян, 2019). Детали выделения нейральной сетчатки и длительного процесса культивирования как такового описаны в статьях (Новикова и др., 2010; Grigoryan et al., 2016).

При ротационном органотипическом культивировании *in vitro* вначале в результате смыкания краев (периферии) сетчатки тритона формировались замкнутые структуры – сфероиды с обращенным наружу фоторецепторным слоем (рис. 3). Через 2 недели, несмотря на гибель отдельных фоторецепторов и клеток внутренней сетчатки, в образованных сфероидах сохранялась послойная организация. Вблизи зоны смыкания сфероида в

НЯС и ВЯС обнаруживались многочисленные митозы. В НЯС митотические клетки располагались среди тел фоторецепторов, а в ВЯС – часто вблизи длинного отростка клеток Мюллера (Новикова и др., 2010; Grigoryan et al., 2016).

На полутонких срезах была очевидной гипертрофия клеток Мюллера, выражающаяся в значительном увеличении размеров ядер, числа ядрышек и толщины длинных отростков этих клеток. В этой популяции отдельные клетки также находились в митотической фазе. Через 2 нед. культивирования в центральной области сетчатки, далекой от периферии, были видны потоки мигрирующих из ВЯС в НЯС клеток, и также многочисленные митозы. Все это явилось свидетельством активного участия внутреннего резерва регенерации сетчатки тритона – клеток ЦМЗ, а также, возможно, локализующихся в ВЯС потомков клеток Мюллера и биполяро-подобных клеток (Новикова и др., 2010).

Через 4 нед. культивирования сетчатки тритона происходило смешение ВЯС и НЯС, прорастание нейральных отростков клеток в полость сфероида. Клетки в митотической фазе встречались чаще, чем через 2 нед. В результате значительная часть клеток в таких сфероидах, проанализированных на сериях полутонких срезах, имела характерные признаки нейробластов (рис. 3г).

Таким образом, в процессе длительного органотипического культивирования *in vitro*, неизбежно сопровождающегося ограниченной клеточной гибелью, в частности в популяции фоторецепторных клеток, имеют место восстановительные процессы и реконструкция взрослой нейральной сетчатки (вне РПЭ), использующая у тритона внутренние клеточные источники и механизмы для восстановления.

Исследование сетчатки тритона в ходе органотипического культивирования с помощью молекулярных методов подтвердило полученные нами морфологические сведения. О наличии значительного числа малодифференцированных клеток в культивируемой в течение 4-х нед. сетчатке тритона свидетельствовали данные исследования, выполненного с помощью ПЦР. Была обнаружена высокая экспрессия генов, кодирующих ßII тубулин (ßII-tub) и нуклеостемин (Ns) (белков – маркеров низкого уровня дифференцировки). Параллельно были выявлены транскрипты регуляторного фактора Fgf2, ответственного за клеточную дедифференцировку и пролиферацию (Новикова, 2010; Маркитантова и др., 2014).

На данной модели было проведено также определение эффективности митохондриального антиоксиданта SkQ1 в поддержании жизнеспособности, пролиферативной активности и способности к изменению фенотипа клеток. Отличия от контроля (без внесения фактора в среду) выражались не только в увеличении численности жизнеспособных клеток, но и общем уровне пролиферативной активности, и дедифференцировки клеток культивируемых сетчаток. Через 30 дней культивирования число дедифференцированных клеток, в присутствии SkQ1 в среде, в некоторых случаях достигало 80% от общего числа клеток (Новикова, 2010).

С использованием органотипического культивирования изучен еще один аспект регенерации сетчатки у тритонов (*Cynops pyrrhogaster*), а именно роли взаимодействия РПЭ с подлежащими тканями – хороидальной и склеральной оболочками, входящими с состав задней стенки глаза, в регенерации нейральной сетчатки не из собственного внутреннего резерва, а из клеток РПЭ (Mitsuda et al., 2005). Обнаружено, что хороидальная (сосудистая) оболочка необходима для осуществления процесса регенерации. Изолированный от хороида РПЭ не пролиферировал, но в присутствии сосудистой оболочки, даже будучи отделенным от нее мембранным фильтром, мог проявить свои регенераторные возможности – пролиферацию и трансдифференцировку в клетки сетчатки. Исследование роли ростовых факторов, источником которых мог быть хороид – Fgf2 и Igf1, указало на ведущую роль Fgf2, а Igf1 мог воздействовать на инициацию и прогресс регенерации сетчатки из РПЭ только совместно с Fgf2. По данным ПЦР в реальном времени, имело место увеличение экспрессии в тканях задней стенки глаза генов, кодирующих оба этих фактора, вскоре после удаления сетчатки. Это подтверждало предположение о роли хороида, как источника факторов, в регенерации сетчатки у тритона за счет клеток РПЭ (Mitsuda et al., 2005).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ПТИЦ

Модели культивированной сетчатки птиц в основном применяли для решения вопросов, связанных с развитием этой ткани. При этом часто использовали срезы и реагрегационные (формирующиеся из клеточной суспензии) культуры сетчатки эмбрионов цыпленка. Так, работа на срезах эмбриональной сетчатки цыпленка в условиях ротационного культивирования определила, что модель полностью удовлетворяет задачам исследования – изучению дифференцировки нейронов и глиальных клеток сетчатки. Более того на модели было успешно изучено дозо-зависимое действие на ретиногенез блокатора Na+ каналов, мексилетина, подтверждающее пригодность модели также для токсикологических исследований (Hoff et al., 1999). Изолированную сетчатку цыпленка (E6) культивировали органотипически при постоянном вращении, что обеспечило хорошую ее жизнеспособность и позволило провести дробную фиксацию образцов в течение трех недель для иммунохимического изучения хода развития. Ин-

тересным наблюдением явилось развитие фоторецепторов в отсутствие РПЭ. С помощью электронной микроскопии был обнаружен рост наружных отростков фоторецепторных клеток вне контакта с пигментированным эпителием сетчатки (Thangaraj et al., 2011).

Прицельное исследование роли ростовых факторов в развитии сетчатки цыпленка было проведено с помощью использования блокатора их действия сурамина (suramin) (Cirillo et al., 2001). Культивирование эмбриональной сетчатки цыпленка в течение суток в присутствии сурамина (50–200 мкМ) приводило к подавлению пролиферации, клеточной дезинтеграции и нарушению формирования наружной пограничной мембраны. Проявление эффекта сурамина оказалось дозозависимым и могло быть нивелировано присутствием в среде FGF-2, что подтверждало ведущую роль этого ростового фактора в развитии сетчатки позвоночных.

Широкая серия работ проведена на реагрегационных культурах сетчатки цыпленка с целью выявления закономерностей развития и восстановления сетчатки, а также влияния на этот процесс различных факторов (Layer, Willbold, 1989; Wolburg et al., 1991, Willbold, Layer, 1992). При таком подходе реагрегационные культуры могли быть получены, элиминируя (или напротив, сохраняя), те или иные области сетчатки при ее выделении (брались только центральная область сетчатки, сетчатка с краевой (ЦМЗ) зоной, сетчатка вне и с РПЭ). Так, при сохранении при выделении сетчатки ЦМЗ вместе с прилежащими пигментированными клетками, в формирующихся ретинотипических стратифицированных сфероидах при реагрегации клеток сетчатки цыпленка стадии E9 были обнаружены скрытые регенерационные возможности этой ростовой области глаза. В течение длительного времени наблюдалась пролиферация и дифференцировка клеток ЦМЗ, тогда как процесс пополнения сетчатки за счет этого источника *in vivo* подавляется уже на стадии E4 (Willbold, Layer, 1992). При этом клетки ЦМЗ в пролиферативной фазе с образованием нейронов сетчатки *de novo* находились долго. Этот период сопровождался присутствием в ЦМЗ бутирилхолинэстеразы – фермента, экспрессия которого находится в корреляции с фазой перехода клеток от пролиферации к дифференцировке. В результате был сделан важный вывод, что потенции клеток ЦМЗ к пролиферации и пополнению клеточного состава сетчатки цыпленка сохраняются как минимум до стадии E9 (Willbold, Layer, 1992). Роль периферической части РПЭ в гистогенезе ретинотипических стратифициованных сфероидов была исследована в работе (Wolburg et al., 1991). Авторам удалось выяснить, что корректная, сопоставимая с нормальной *in vivo* послойная организация, а также рост отростков клеток глиальных клеток Мюллера и формирование при их участии ограничивающих наружной и внутренней мембран, зависят от наличия в реагрегационных культурах клеток РПЭ.

Так же как это было показано в отношении роли хороидальной оболочки в регенерации сетчатки из клеток РПЭ у тритона, существенная роль этой структуры была установлена в стимуляции роста отростков нейральных клеток при культивировании диссоциированных клеток эксплантатов сетчатки цыпленка. Действие экстракта хороида глаза цыпленка (E18) сравнивали с действием хорошо известного нейротрофического фактора CNTF. Для обоих факторов был обнаружен как стимулирующий эффект, так и дозовая зависимость роста аксонов от концентраций факторов в среде (Carri et al., 1994). Это дало основание предполагать, что сосудистая оболочка обладает широким набором факторов, имеющих сигнальное и трофическое значение при регенерации и развитии сетчатки глаза амфибий и птиц.

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Для млекопитающих инструмент органотипического культивирования оказался не менее эффективным для решения многих вопросов, связанных с развитием и регенерацией сетчатки. Было показано (Pinzón-Duarte, 2000), что сетчатка неонатальных, рождающихся слепыми мышей, находится в состоянии гистотипического развития, не только успешно переживает условия эксплантации и культивирования, но и демонстрирует завершение формирования слоев и клеточных типов, аналогично сформированным *in vivo*. Интересно, что для развития фоторецепторов и наружной пограничной мембраны оказался необходим РПЭ, который, однако, не требовался для правильного развития внутренней сетчатки, дифференцировки ее клеток, роста отростков нейронов и синаптогенеза (Pinzón-Duarte, 2000). Известны также наблюдения, свидетельствующие о том, что развитие сетчатки неонатальных мышей может успешно происходить и в бессывороточной среде (Caffe et al., 2001).

Что касается культивирования сетчатки постнатальных мышей, то в этом случае в среде без сыворотки не только сохраняется ее, уже в основном сформированная структура, но и наблюдается продолжающийся рост нейральных отростков, хотя и обнаруживаются потери в популяции клеток НЯС (Caffe et al., 2001). В работе (Bandyopadhyay, Rohrer, 2010) органотипическое культивирования сетчаток постнатальных мышей также не препятствовало нормальному развитию ткани, в частности формированию фоторецепторов. Ткань сетчатки была помещена в условия органного

культивирования на стадии P7, когда ВЯС был сформирован, но предшественники палочек еще не завершили активную миграцию в сторону НЯС, в слой, полное формирование которого завершается на стадиях P10–P12. *In vivo* в дальнейшем происходит рост наружных отростков фоторецепторов и становление сетчатых слоев. После 11 дней культивирования *in vitro* сравнение проводилось с тканью сетчатки при нормальном развитии *in vivo* на стадии P18, когда в целом гистогенез сетчатки мыши завершается. Сравнение продемонстрировало не только сохранение структуры сетчатки, сформированной до срока помещения ткани в культуру, но и дальнейшее корректное формирование НЯС. В дополнение к этим результатам была выявлена продукция 11-цис ретиналя клетками РПЭ, обеспечивающего поддержку развития колбочек и сигнальную фототрансмиссию (Bandyopadhyay, Rohrer, 2010).

В течение 10 дней были культивированы эксплантаты сетчаток развивающихся (стадии P3 и P10) и взрослых (P60) мышей. Была выявлена лучшая жизнеспособность нейронов сетчатки, полученной от развивающихся мышей по сравнению с сетчаткой взрослых животных. Методы цитофлуориметрии и иммуноцитохимии помогли установить уровень клеточной гибели, а также ее связь с объемами и распределением в сетчатке клеток микроглии/макрофагов – популяции, представляющей систему фагоцитов, объемы которой могут свидетельствовать об уровне дегенерации сетчатки (Ferrer-Martin et al., 2014).

Органотипическое длительное (до 2–3-х нед.) культивирования развивающейся сетчатки грызунов представляется в настоящее время удобной моделью для проведения ретровирусной трансфекции. Главным направлением этих исследований являются попытки переноса генов в ретинальные прогениторы для понимания роли тех или иных регуляторных транскрипционных факторов в дифференцировке и последовательности созревания определенных специфических клеточных типов сетчатки (Hatakeyama, Kageyama, 2002; Zhang et al., 2002).

Существуют примеры успешного органотипического культивирования сетчаток не только эмбрионов или постнатальных мышей, но и полученных от взрослых особей. Так в работе (Müller et al., 2017), проведенной с использованием иммунохимии и ПЦР анализа, удалось показать, что условия *in vitro* способны поддерживать ткань минимум в течение 10 дней. Обнаружилось также, что в первые 4 дня имеют место характерные изменения, в частности активация клеток Мюллера, изменения фоторецепторных отростков, а также сети нейритов биполярных клеток.

Мы предприняли попытку ротационного органотипического культивирования изолированной целой (без РПЭ) сетчатки взрослой (2 мес.) крысы в течение 10 сут. Подробно процедуры выделения, культивирования и последующего анализа описаны в статье (Новикова и др., 2010). К концу культивирования сетчатка крысы сохраняла жизнеспособность, но претерпевала значительные морфологические изменения. Сетчатки крысы *in vitro* образовывали сфероиды разной степени закрытия. Последнее определяло жизнеспособность клеток. В открытых сфероидах при сохранении послойной организации клеточная гибель была высокой, отсутствовали признаки пролиферации не нейрональных клеток, а резидентные макрофаги активно заселяли запустевающий в результате гибели клеток ганглиозный слой. Резидентные макрофаги в сетчатке крысы входят в относительно большую гетерогенную популяцию микроглиальных клеток и макрофагов, различающихся в зависимости от состояния сетчатки распределением по ее толще, по экспрессии некоторых антигенов, а также морфологически (Chang et al., 2005). Мы опирались на морфологические характеристики, значительно отличающие эти клетки от других клеток сетчатки (крупные размеры, округлая или амебоидная форма клеток).

В случае полного закрытия сфероида сетчатки крысы инициировались реорганизация в ткани и клеточные ответы, свидетельствующие о реконструкции (рис. 4). Тела обращенных наружу фоторецепторных клеток теряли отростки, частично гибли и смещались во внутреннюю часть сфероида, в результате чего клетки ВЯС оказывались в наружной его части, вблизи наружной пограничной мембраны. Такое поведение клеток наблюдается у крыс и при иллюминации ярким светом (Grigoryan et al., 2016). Клетки ганглиозного слоя сохраняли при этом прежнюю локализацию. Тела клеток в толще сфероида, обладали высокой жизнеспособностью, а некоторые (не нейрональные) клетки и митотической активностью: на каждом из серийных срезов таких сфероидов мы обнаруживали 1–3 картины митотических делений. Изучение клеток в фазе М и их локализации свидетельствовало о том, что пролиферативной активностью обладают две клеточные популяции: крупные макрофагальные клетки и отдельные мелкие клетки, принадлежащие ВЯС (рис. 4в, 4г). Последние представляли собой с высокой вероятностью активированные клетки Мюллера, популяции – потенциального источника регенерации клеток сетчатки, в частности, фоторецепторов у мышей (Jorstad et al., 2017).

Таким образом, данные полученные с помощью органотипического культивирования сетчатки взрослых крыс, свидетельствуют о возможности структурных изменений и активации регенерационных ответов в переживающей *in vitro* ткани сетчатки. Механизмы, используемые при

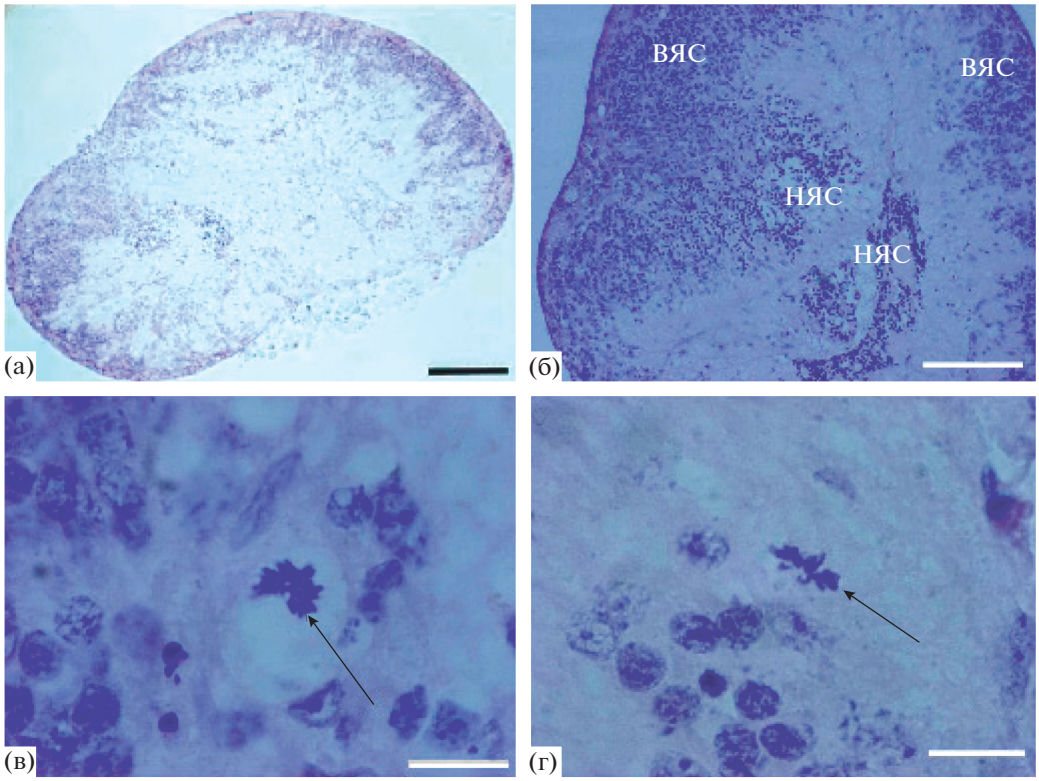

Рис. 4. Сетчатка крысы, экспонированная 10 дней в условиях ротационного органотипического культивирования. (а, б) – общий вид при завершении культивирования, НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, масштабные отрезки: (а) – 500 мкм, (б) – 100 мкм; (в, г) – митозы ненейральных клеток во внутренней части сетчатки (стрелки), масштабные отрезки – 10 мкм.

этом – транслокация клеток ВЯС наружу на фоне частичной гибели в НЯС, смещение тел фоторецепторов вовнутрь, реакция со стороны макроглии, а также относительная устойчивость послойной организации и ограниченная пролиферация не нейрональных клеток (Новикова и др., 2010, Grigoryan et al., 2016).

С использованием органотипического культивирования изучали действие на клетки сетчатки крысы токсина и одного из факторов, обладающих нейропротекторным действием. Особое внимание было обращено на уязвимые при различных патологиях сетчатки клетки ганглиозного слоя и их отростки. Для этого предварительно, до эксплантации сетчатки, еще *in vivo* в зону окончания зрительного нерва у области зрительного анализатора в мозге с помощью внутричерепного введения была доставлена флуоресцентная метка (FluoroGold), которая, распределяясь по волокнам нерва, позволяла окрасить как тела, так и отростки ганглиозных клеток. После чего такие сетчатки выделяли и культивировали в присутствии гентамицина, добавленного в среду в токсических концентрациях (Smedowski et al., 2018). Вызванный гентамицином оксидативный стресс приводил к значительному повреждению клеток, разрушению их отростков, сопровождающихся быстрым выбросом фермента лактатдегидрогеназы – маркера клеточного разрушения. Добавление цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) приводило к значительному (хоть и неполному) устранению данных негативных показателей в популяции ганглиозных клеток и формирующих зрительный нерв их отростков в ответ на действие токсина (Smedowski et al., 2018).

Мы в качестве эффективного антиоксиданта и нейропротектора для предотвращения клеточной гибели сетчатки крысы, культивированной *in vitro* в составе задней стенки глаза, использовали SkQ1. Добавление 20 нМ этого эффективного, защищающего митохондрии клеток, препарата приводило к значительному сокращению клеточных потерь в ганглиозном слое на 7 сут и предотвращению гибели и дезинтеграции клеток ВЯС на 14 сут ротационного органотипического культивирования (Grigoryan et al., 2013).

Работа по изучению действия оксислительного стресса на ретинальные клетки проведена также на сетчатке свиньи, как известно, очень близкой по строению к сетчатке человека (Hurst et al., 2017). В качестве агента, индуцирующего стресс, использовали перекись водорода (H_2O_2) в кон-

центрациях 100, 300 и 500 мкМ. Была проведена оценка снижения количества жизнеспособных клеток ганглиозного слоя, экспрессии генетических маркеров оксидативного стресса, белка теплового шока Hsp70, маркеров воспаления, увеличение популяции микроглии, а также активации макроглиальных клеток. Эта работа позволила предложить модель для тестирования не только факторов защиты сетчатки от оксидативного стресса, но и других протекторов сетчатки, а также для исследования молекулярных механизмов гибели ретинальных клеток (Hurst et al., 2017).

При культивировании сетчатки свиньи (Kaempf et al., 2008) выяснилось, что РПЭ ответственен за степень проявления реактивного глиоза – реакции глиальных клеток Мюллера на структурные и метаболитические нарушения в сетчатке (deHoz et al., 2016). Активация клеток Мюллера, выражающаяся в гипертрофии, увеличении белков промежуточных филаментов (глиального фибриллярного белка (Gfap) и виментина (Vimentin), оказалась значительно снижена при сохранении взаимосвязи нейральной сетчатки и РПЭ. Наряду с этим была снижена клеточная гибель в НЯС, ВЯС и ганглиозном слоях сетчатки (Kaempf et al., 2008). В другом исследовании на модели сетчатки свиньи (комплекс: хороид-РПЭ-нейральная сетчатка) были созданы условия для постоянной перфузии свежей порции среды, и сохранения тем самым комплекса wholemount и проведения дробной фиксации образцов в течение 10 дней (Kobuch et al., 2008). Для оценки состояния сетчатки иммуногистохимически анализировали широкий ряд параметров – клеточные пролиферацию, жизнеспособность, рост отростков, а также иммунофенотипы фоторецепторных и глиальных клеток. Это позволило убедительно показать, что модель может быть применена для тестирования офтальмологических препаратов, что позволяет сократить число исследований на животных *in vivo*.

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА

Органотипическое культивирование эксплантированной сетчатки человека выглядит хорошим инструментом для проведения самых разнообразных исследований биомедицинского направления – моделирования заболеваний и патологий сетчатки, для доклинических испытаний препаратов и токсикологических тестов. Однако в литературе существует только малое число работ, проведенных с использованием эксплантатов сетчатки человека. В ранних работах был описан рост отростков нейральных клеток сетчатки человека *in vitro*, а также дано описание отличий по этому параметру регенерации у разных доноров, в зависимости от субстрата и присутствия стимуляторов, в частности наличия Шванновских клеток в среде, способствующих росту нейральных отростков (Thanos, Thiel, 1990; Hopkins, Bunge, 1991). Позднее в работе (Osborne et al., 2016) была сделана попытка моделирования хронической, последовательной дегенерации ганглиозных клеток, которые вне зависимости от донора и времени забора материала (в границах 24 ч после смерти), были успешно маркированы с помощью антител к нейрональному ядерному антигену (NeuN), βIII тубулину (βIII-tub), и антигену поверхности C90 (Thy-1). Параллельное изучение экспрессии этих маркерных молекул, а также апоптоза, позволило оценить динамику гибели ганглиозных клеток по пространству сетчатки, в частности в области макулы, высокочувствительной ее области фовеа и вблизи нее (Osborne et al., 2016). Недавно на той же модели проведено тестирование некоторых перспективных нейропротекторов сетчатки человека. Среди них в отношении защиты ганглиозных клеток сетчатки была выявлена эффективность мезенхимных стволовых клеток человека и производимых ими нейропротекторных факторов, а также PDGF (выделенного из тромбоцитов ростового фактора) (Osborne et al., 2018).

Эксплантаты сетчатки человека *in vitro* были использованы и в исследованиях ее регенерационных потенций. Выяснено (Mayer et al., 2005), что клетки – потенциальные источники восстановления, называемые авторами нейральными предшественниками, (присутствие которых в сетчатке предполагается и широко обсуждается, Григорян, 2019), способны в сетчатке человека *in vitro* менять свой фенотип и затем дифференцироваться в различные типы нейронов. В работе Майер с соавторами использовали эксплантаты фрагментов сетчатки, взятых из разных ее областей, а также отдельно краевой области *pars plana*. Эксплантаты были получены от взрослых доноров (15–87 лет) сразу после смерти и культивированы в присутствии широкого набора ростовых факторов, включая FGF-2. В клетках, выселяющихся и мигрирующих *in vitro* из таких эксплантатов, были обнаружены отдельные признаки нейральных прогениторов: пролиферация, экспрессия нестина, а также способность этих клеток формировать нейросферы. Авторы, к сожалению, не дают ответа на вопрос о происхождении таких клеток во взрослой сетчатке человека, но предлагают модель для дальнейшего исследования регенерационных возможностей зрелой сетчатки человека в условиях органотипического культивирования для терапевтических целей (Mayer et al., 2005).

Обнаружено также, что предшественники фоторецепторных клеток в ретинальных эксплантатах плода человека, а также мыши, дифференцируются быстрее в присутствии как сетчатки человека, так и РПЭ, полученного из эмбриональных

стволовых клеток (ЭСК) человека (Yanai et al., 2015). На культурах сетчатки человека с перспективой в дальнейшем генетической терапии было сделано несколько попыток переноса генов с помощью вирусной трансфекции. Успешной оказалась попытка с помощью этой технологии реактивировать фоторецепторные клетки в отсутствие у них наружного сегмента, (а потому и фоточувствительности), а также восстановить активность ганглиозных клеток эксплантированной сетчатки человека, используя лентивирусные и аденовирусные векторы (Sengupta et al., 2011).

Накопленный опыт культивирования сетчатки человека *ex vivo* недавно представлен в обзоре Мурали и соавторов (Murali et al., 2018). Там, в частности, указывается на то, что, несмотря на всю привлекательность модели эксплантированной сетчатки человека и ее культивирования для исследований развития и регенерации, моделирования патологий, а также токсикологических тестов и доклинических исследований, для широкого использования модели существует большое число ограничений. Прежде всего, это – сложность в получении постмортального материала сетчатки доноров, отсутствии информации о состоянии сетчатки – наличия у донора тех или иных заболеваний, способных затронуть сетчатку глаза. Следует отметить также, что при выделении сетчатки неизбежна отмеченная выше аксотомия, которая сопровождается ретроградной гибелью отростков, а затем и тел ганглиозных клеток. При выделении имеет место также клеточный стресс, а также метаболитические изменения, которые в ходе культивирования в условиях изоляции сетчатки от окружающих ее тканей глаза только усиливаются. При этом по понятной причине невозможно и получение контролей – нормальной функционирующей ткани здоровой сетчатки человека (Murali et al., 2018).

Приведенные выше работы, выполненные при использовании органотипического культивирования сетчатки эмбрионов и взрослых животных разных классов и видов позвоночных, а также на сетчатке человека, на фоне постоянно совершенствующейся техники культивирования и достижений в исследовании стволовых клеток, заложили основу для использования метода органотипического культивирования при получении так называемых органоидов сетчатки.

ОРГАНОИДЫ СЕТЧАТКИ – ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Как мы неоднократно упоминали выше, жизнеспособность ткани сетчатки значительно увеличивается в обновляющейся среде культивирования, позволяющей лучшую доставку веществ, а также элиминацию продуктов метаболизма. В настоящее время помимо органотипического ротационного и стационарного культивирования с этой целью используют так называемые биореакторы, значительно увеличивающие время культивирования, а также позволяющие анализировать биологические и биохимические процессы в сетчатке под строгим мониторингом условий *in vitro*, таких как температура, pH, уровень кислорода и т.д. (Martin et al., 2004; Antoni et al., 2015).

Особое значение эти новые технологические возможности имеют для разработки техники получения так называемых органоидов сетчатки с целью их дальнейшего применения для трансплантации в случаях клеточных потерь при заболеваниях или повреждениях сетчатки млекопитающих и человека (Ader, Tanaka, 2014; Llonch et al., 2018; DiStefano et al., 2018). Использование биореакторов (Ovando-Roche et al., 2018) и технология получения органоидов сетчатки для 3D культивирования постоянно совершенствуются (Reichman et al., 2017; DiStefano et al., 2018; Capowski et al., 2019). Отмечается, что эти достижения имеют хорошие перспективы для получения дифференцированных (в разной степени от предшественников до зрелых нейронов) клеток сетчатки для трансплантации, в частности наиболее часто погибающих фоторецепторов, клеток РПЭ, а также для тестирования различных препаратов и проведения процедур геномодификации. Особое значение очень медленно развивающиеся органоиды сетчатки имеют и для изучения дифференцировки клеточных типов сетчатки и молекулярных регуляторов этого процесса.

Материалом для получения и формирования *in vitro* органоидов сетчатки служат эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мышей и человека (рис. 5). Ранее было показано, что при формировании и развитии ретинальных органоидов имеет место спонтанное воспроизведение процессов, сопоставимых с таковыми при ретиногенезе *in vivo* (Eiraku et al., 2011, Nakano et al., 2012). При соблюдении адекватных условий *in vitro* культивируемые стволовые клетки начинают развиваться в нейроэпителиальном направлении, после чего образовавшийся нейроэпителий инвагинирует таким же образом как это происходит при развитии глазного бокала *in vivo*. В дальнейшем в результате самоорганизации эта структура претерпевает дифференцировку клеточных типов и морфогенез, формируя стратифицированную ткань, содержащую дифференцированные интернейроны и фоторецепторные клетки (Eiraku et al., 2011, Nakano et al., 2012). Интересно, что процесс созревания сетчаточных органоидов происходит быстрее в условиях гипоксии, симулирующих условия развития сетчатки в эмбриогенезе *in vivo* (Chen et al., 2016).

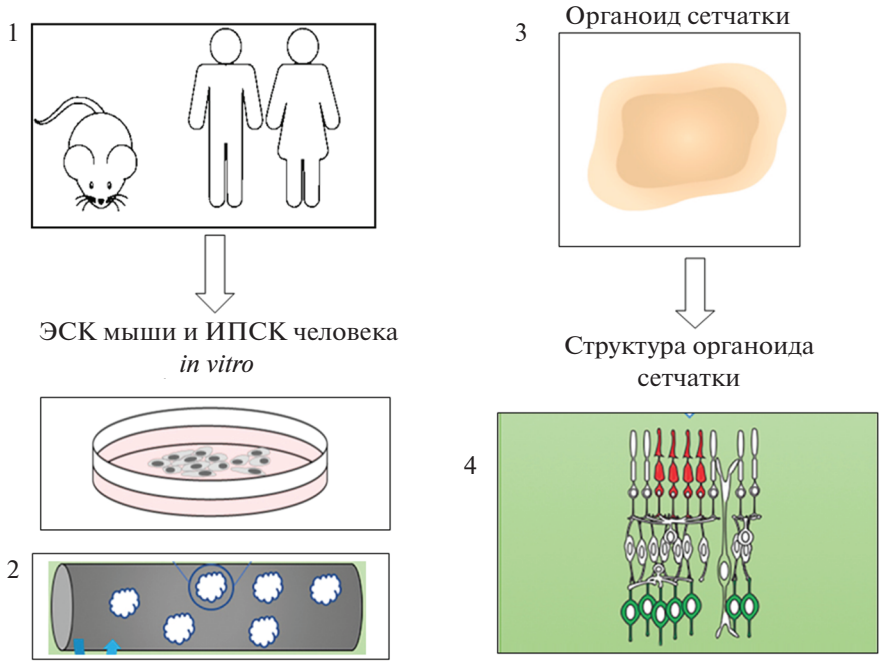

Рис. 5. Этапы получения органоидов сетчатки. 1 – выделение стволовых клеток (ЭСК и ИПСК), 2 – культивирование стволовых клеток и перенесение во вращающиеся биореакторы, 3 – формирующиеся органоиды, 4 – внутренняя структура органоида.

Более того, помимо структурного сходства с сетчаткой, в культивируемых органоидах можно добиться и рекапитуляции существующих *in vivo*, биологических и метаболитических ее параметров (Yin et al., 2016; Browne et al., 2017). Однако есть и пока не преодоленные недостатки полученных *in vitro* сетчаточных органоидов. Отмечается, что они плохо доступны для проникновения различных факторов, а также не имеют необходимого для той же цели кровоснабжения (McMurtrey, 2016). Помимо этого отмечено отсутствие формирования сетчатых синаптических слоев (НСС и ВСС), а также слоя ганглиозных клеток. Подробная информация о способах культивирования органоидов сетчатки, полученных из ИПСК человека с целью получения клеточного материала для трансплантаций, представлена недавно в обзоре Лонч и соавторов (Llonch et al., 2018).

Особым направлением, получившим свое развитие совсем недавно, является применение органоидов сетчатки, полученных из ИПСК пациентов (patient-specific organoids), страдающих тем или иным генетическим заболеванием сетчатки (Foltz, Clegg, 2019). Пока используются модели патологий сетчатки, для которых уже хорошо известны генетические мутации и их клеточные и функциональные последствия. Одна из немногочисленных таких работ посвящена коррекции последствий пигментного ретинита (PR) – распространенного генетического заболевания сетчатки, приводящего к слепоте. Денг и соавторы (Deng et al., 2018) при использовании техники CRISPR-Cas9 на клетках органоидов, полученных из ИПСК пациентов, страдающих этим заболеванием, провели коррекцию несущего мутацию гена *RPGR* – регулятора ГТФазы, одного из основных генов, ответственных за развитие PR. Это позволило предотвратить нарушение строения фоторецепторов и РПЭ, вернуть клеткам их электрофизиологические свойства, а также восстановить генетическую экспрессию *RPGR* в фоторецепторных клетках до уровня контрольного. Можно предвидеть, что с развитием способов получения органоидов, в том числе персонифицированных, с дальнейшим совершенствованием способов органотипического культивирования, а также методов коррекционной геномодификации, это направление в ближайшие годы получит особое развитие, открывающее перспективы генетической терапии наследственных, пока неизлечимых заболеваний сетчатки глаза.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, № ГЗ 0108-2018-0005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Григорян Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации “молодого” фенотипа клеток-источников регенерации тканей глаза // Биохимия. Т. 83. № 11. С. 1629–1644. (*Grigoryan E.N.* Molecular factors of the maintenance and activation of the juvenile phenotype of cellular sources for eye tissue regeneration //

Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 11. P. 1318–1331).

Григорян Э.Н. Эндогенные клеточные источники для регенерации сетчатки у позвоночных животных и человека // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 1. С. 12–26. (*Grigoryan E.N.* Endogenous cell sources for eye retina regeneration in vertebrate animals and humans // Russian Journal of Developmental Biology (Ontogenez). 2018. V. 49. № 6. P. 1–13).

Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты FGF сигнального пути в тканях заднего сектора глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* // Известия РАН. Сер. биол. 2014. № 4. С. 325–333. (*Markitantova Y.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N.* FGF2 signaling pathway components in tissues of the posterior eye sector in the adult newt *Pleurodeles waltl* // Biol. Bull. (Moscow). 2014. V. 41. P. 297–305).

Новикова Ю.П. Выявление и активация *in vitro* скрытых регенерационных потенций сетчатки глаза позвоночных животных. Дис. ... канд. биол. наук. М.: ИБР РАН, 2010.

Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Краснов М.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Сетчатка глаза взрослых тритона и крысы в условиях органотипического культивирования *in vitro* // Известия РАН. Сер. биол. 2010. № 4. С. 389–402. (*Novikova Yu.P., Aleynikova K.S., Krasnov M.S., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. In vitro* organotypic cultivation of adult newt and rat retinas // Biology Bulletin (Izvestiya RAN). 2010. V. 37. № 4. P. 327–338).

Ader M., *Tanaka* E.M. Modeling human development in 3D culture // Curr. Opin. Cell Biol. 2014. V. 31. P. 23–28.

Al-Ali H., Beckerman S.R., Bixby J.L. Lemmon V.P. In vitro models of axon regeneration // Exp. Neurol. 2017. V. 287. P. 423–434.

Amini R., Rocha-Martins M., Norden C. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina // Front. Neurosci. 2018. V. 11. P. 742.

Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel J. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo* // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 5517–5527.

Bandyopadhyay M., Rohrer B. Photoreceptor structure and function is maintained in organotypic cultures of mouse retinas // Mol. Vis. 2010. V. 16. P. 1178–1185.

Boyd W.H. A chamber for organotypic culture adapted for growing large volumes of tissue // Stain. Technol. 1971. V. 46. P. 85–87.

Braschler U.F., Iannone A., Spenger C., Streit J., Lüscher H.R. A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle // J. Neurosci. Methods. 1989. V. 29. P. 121–129.

Browne A.W., *Arnesano C., Harutyunyan N., Khuu T.*, *Martinez J.C., Pollack H.A., Koos D.S., Lee T.C., Fraser S.E., Moats R.A., Aparicio J.G., Cobrinik D.* Structural and functional characterization of human stem-cell-derived retinal organoids by live imaging // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. V. 58. P. 3311–3318.

Caffé A.R., Söderpalm A., van Veen T. Photoreceptor-specific protein expression of mouse retina in organ culture and retardation of rd degeneration *in vitro* by a combination of basic fibroblast and nerve growth factors // Curr. Eye Res. 1993. V. 12. P. 719–726.

Caffé A.R., Ahuja P., Holmqvist B., Azadi S., Forsell J., Holmqvist I., Söderpalm A.K., van Veen T. Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium // J. Chem. Neuroanat. 2001. V. 22. № 4. P. 263–273.

Capowski E.E., Samimi K., Mayerl S.J., Phillips M.J, Pinilla I., Howden S.E., Saha J., Jansen A. D., Edwards K.L., Jager L.D., Barlow K., Valiauga R., Erlichman Z., Hagstrom A., Sinha D., Sluch V.M., Chamling X., Zack D.J., Skala M.C., Gamm D.M. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines // Development. 2019. V. 146. № 1: dev171686.

Carri N.G., Richardson P., Ebendal T. Choroid coat extract and ciliary neurotrophic factor strongly promote neurite outgrowth in the embryonic chick retina // Int. J. Dev. Neurosci. 1994. V. 12. P. 567–578.

Chen H.Y., Kaya K. D., Dong L., Swaroop A. Three-dimensional retinal organoids from mouse pluripotent stem cells mimic *in vivo* development with enhanced stratification and rod photoreceptor differentiation // Mol. Vis. 2016. V. 22. P. 1077–1094.

Cho H.J., Verbridge S.S., Davalos R.V., Lee Y.W. Development of an *in vitro* 3D brain tissue model mimicking *in vivo*-like pro-inflammatory and pro-oxidative responses // Ann. Biomed. Eng. 2018. V. 46. P. 877–887.

Chohan A., Singh U., Kumar A., Kaur J. Müller stem cell dependent retinal regeneration // Clinica Chimica Acta. 2017. V. 464. P. 160–164.

Cirillo A., Chifflet S., Villar B. Neural retina of chick embryo in organ culture: effects of blockade of growth factors by suramin // Cell Tissue Res. 2001. V. 304. № 3. P. 323–331.

Defoe D.M., Easterling K.C. Reattachment of retinas to cultured pigment epithelial monolayers from *Xenopus* laevis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994. V. 35. P. 2466–2476.

Deng W.-L., Gao M.-L., Lei X.-L., Lv J.-N., Zhao H., He Kai-Wen., Xia X.-X., Li L.-Y., Chen Y.-C., Li Y.P., Pan D., Xue T., Jin Z.-B. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients // Stem Cell Reports. 2018. V. 10. P. 1267–1281.

DiStefano T., Chen H.Y., Panebianco C., Kaya K.D., Brooks M.J., Gieser L., Morgan N.Y., Pohida T., Swaroop A. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors // Stem Cell Reports. 2018. V. 10. P. 300–313.

Dowling J.E. The Retina. An Approachable Part of the Brain. Revised Edition. Belknap-Harvard Univ. Press, 2012. 384 p.

Eiraku M., Takata N., Ishibashi H., Kawada M., Sakakura E., Okuda S., Sekiguchi K., Adachi T., Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture // Nature. 2011. V. 472. P. 51–56.

Ferrer-Martín R.M., Martín-Oliva D., Sierra A., Carrasco M.-C., Martín-Estebané M., Calvente R., Marín-Teva J.L., Navascués J., Cuadros M.A. Microglial cells in organotypic cultures of developing and adult mouse retina and their relationship with cell death // Exp. Eye Res. 2014. V. 121. P. 42–57.

Feigenspan A., Bormann J., Wässle H. Organotypic slice culture of the mammalian retina // Vis. Neurosci. 1993. V. 10. P. 203–217.

Foltz L.P., Clegg D.O. Patient-derived induced pluripotent stem cells for modeling genetic retinal dystrophies // Prog. Ret. Eye Res. 2019. V. 68. P. 54–66.

Franze K., Grosche J., Skatchkov S.N., Schinkinger S., Foja C., Schild D., Uckermann O., Travis K., Reichenbach A., Guck J. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina // Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. V. 104. P. 8287–8292.

Gähwiler B.H. Organotypic cultures of neural tissue // Trends Neurosci. 1988. V. 11. P. 484–489.

Gähwiler B.H., Capogna M., Debanne D., McKinney R.A., Thompson S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age // Trends Neurosci. 1997. V. 20. P. 471–477.

Gähwiler B.H., Thompson S.M., Muller D. Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of CNS tissue // Curr. Protoc. Neurosci. 2001. Chapter 6: Unit 6.11.

Germer A., Jahnke C., Mack A., Enzmann V., Reichenbach A. Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Müller (glial) cells in retinal organ cultures // Neuroreport. 1997. V. 8. P. 3067–3072.

Gramage E., Li J., Hitchcock P. The expression and function of midkine in the vertebrate retina // Br. J. Pharmacol. 2014. V. 171. P. 913–923.

Grigoryan E.N., Novikova Y.P., Gancharova O.S., Kilina O.V., Philippov P.P. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat eye retinal pigment epithelium and choroid under conditions of long-term organotypic cultivation // Adv. Aging Res. 2012. V. 1. P. 31–37.

Grigoryan E. N., Novikova Y. P., Kilina O. V., Philippov P.P. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat neural retina under conditions of long-term organotypic cultivation // Adv. Aging Res. 2013. V. 2. P. 65–71.

Grigoryan E. Shared triggering mechanisms of retinal regeneration in lower vertebrates and retinal rescue in higher ones // Tissue Regeneration – From Basic Biology to Clinical Application. Croatia. In Tech. 2012. P. 145–164.

Grigoryan E.N., Poplinskaya V.A., Novikova Y.P. Retinal remodeling under conditions of organotypic 3D culturing *in vitro* and after damage *in vivo* in lower and higher vertebrates // New Front. Ophthalmol. 2016. V. 2. P. 66–76.

Halfter W., Deiss S. Axonal pathfinding in organ-cultured embryonic avian retinae // Dev. Biol. 1986. V. 114. P. 296–310.

Hatakeyama J., Kageyama R. Retrovirus-mediated gene transfer to retinal explants // Methods. 2002. V. 28. P. 387–395.

Hoff A., Hämmerle H., Schlosshauer B. Organotypic culture system of chicken retina // Brain Res. Brain Res. Protoc. 1999. V. 4. P. 237–248.

Hoon M., Okawa H., Della Santina L., Wong R.O. Functional architecture of the retina: development and disease // Prog. Retin. Eye Res. 2014. V. 42. P. 44–84.

Hopkins J.M., Bunge R.P. Regeneration of axons from adult human retina *in vitro* // Exp. Neurol. 1991. V. 112. P. 243–251.

de Hoz R., Rojas B., Ramirez A.I., Salazar J.J., Gallego B.I., Triviño A., Ramírez J.M. Retinal macroglial responses in health and disease // Biomed. Res. Int. 2016. V. 2016: 2954721.

Humpel C. Organotypic brain slice cultures: a review // Neuroscience. 2015. V. 305. P. 86–98.

Hurst J., Kuehn S., Jashari A., Tsai T., Bartz-Schmidt K.U., Schnichels S., Joachim S.C. A novel porcine *ex vivo* retina culture model for oxidative stress induced by H_2O_2 // Altern. Lab. Anim. 2017. V. 45. V. 11–25.

Jeon S., Oh I.H. Regeneration of the retina: toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases // BMB Rep. 2015. V. 48. P. 193–199.

Jorstad N.L., Wilken M.S., Grimes W.N., Wohl S.G., Vanden Bosch L.S., Yoshimatsu T., Wong R. O., Rieke F., Reh T.A. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice // Nature. 2017. V. 548. P. 103–107.

Kaempf S., Walter P., Salz A.-K., Thumann G. Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium // J. Neurosci. Meth. 2008. V. 173. P. 47–58.

Keefe J.R. An analysis of urodelian retinal regeneration // J. Exp. Zool. 1973. V. 184. P. 185–257.

Kobuch K., Herrmann W.A., Framme C., Sachs H.G., Gabel V.P., Hillenkamp J. Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterization of an organotypic *in vitro* model // Exp. Eye Res. 2008. V. 86. P. 661–668.

Lahne M., Gorsuch R.A., Nelson C.M., Hyde D.R. Culture of adult transgenic zebrafish retinal explants for live-cell imaging by multiphoton microscopy // J. Vis. Exp. 2017. V. 120. P. 55335.

LaVail M.M., Yasumura D., Matthes M.T., Lau-Villacorta C., Unoki K., Sung C.H., Steinberg R.H. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations // Invest. Ophthalmol. Vis Sci. 1998. V. 39. P. 592–602.

Layer P.G., Willbold E. Embryonic chicken retinal cells can regenerate all cell layers *in vitro*, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity // Cell Tissue Res. 1989. V. 258. P. 233–242.

Llonch S., Carido M., Ader M. Organoid technology for retinal repair // Dev. Biol. 2018. V. 433. P. 132–143.

Li Y., Zhang Y., Qi S., Su G. Retinal organotypic culture – a candidate for research on retinas // Tissue Cell. 2018. V. 51. P. 1–17.

Liu L., Cheng S.H., Jiang L.Z., Hansmann G., Layer P.G. 1988. The pigmented epithelium sustains cell growth and tissue differentiation of chicken retinal explants *in vitro* // Exp. Eye Res. 1988. V. 46. P. 801–812.

MacDonald R.B., Randlett O., Oswald J., Yoshimatsu T., Franze K., Harris W.A. Müller glia provide essential tensile strength to the developing retina // J. Cell Biol. 2015. V. 210. P. 1075–1083.

McMurtrey R.J. Analytic models of oxygen and nutrient diffusion, metabolism dynamics, and architecture optimization in three-dimensional tissue constructs with applications and insights in cerebral organoids // Tissue Eng. Part C. Methods. 2016. V. 22. P. 221–249.

Mack A.F., Fernald R.D. Thin slices of teleost retina continue to grow in culture // J. Neurosci. Methods. 1991. V. 36. P. 195–202.

Mack A.F., Fernald R.D. Control of vertebrate retinal cell production // Exp. Neurol. 1992. V. 115. P. 65–68.

Martin I., Wendt D., Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering // Trends Biotechnol. 2004. V. 22. P. 80–86.

Matus P., Cubillos S., Lima L. Differential effect of taurine and serotonin on the outgrowth from explants or isolated cells of the retina // Int. J. Dev. Neurosci. 1997. V. 15. P. 785–793.

Mayer E.J., Carter D.A., Ren Y., Hughes E.H., Rice C.M., Halfpenny C.A., Scolding N.J., Dick A.D. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina // Br. J. Ophthalmol. 2005. V. 89. P. 102–106.

Mitashov V.I. Mechanisms of retina regeneration in Urodele // Int. J. Dev. Biol. 1996. V. 40. P. 833–844.

Mitashov V.I. Retinal regeneration in amphibians // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. P. 893–905.

Mitsuda S., Yoshii C., Ikegami Y., Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster* // Dev. Biol. 2005. V. 280. P. 122–132.

Moritoh S., Komatsu Y., Yamamori T., Koizumi A. Diversity of retinal ganglion cells identified by transient *GFP* transfection in organotypic tissue culture of adult marmoset monkey retina // PLoS One. 2013. V. 8: e54667.

Moritoh S., Tanaka K.F., Jouhou H., Ikenaka K., Koizumi A. Organotypic tissue culture of adult rodent retina followed by particle-mediated acute gene transfer *in vitro* // PLoS One. 2010. V. 5: e12917.

Müller B., Wagner F., Lorenz B., Stieger K. Organotypic cultures of adult mouse retina: morphologic changes and gene expression // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. V. 58. P. 1930–1940.

Murali A., Ramlogan-Steel C. A., Andrzejewski S., Steel J.C., Layton C.J. Retinal explant culture: A platform to investigate human neuro-retina // Clin. Exp. Ophthalmol. 2018. [Epub ahead of print]
https://doi.org/10.1111/ceo.13434

Nakano T., Ando S., Takata N., Kawada M., Muguruma K., Sekiguchi K., Saito K., Yonemura S., Eiraku M., Sasai Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. P. 771–785.

Ogilvie J.M., Speck J.D., Lett J.M., Fleming T.T. A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival // J. Neurosci. Methods. 1999. V. 87. P. 57–65.

Osborne A., Hopes M., Wright P., Broadway D.C., Sanderson J. Human organotypic retinal cultures (HORCs) as a chronic experimental model for investigation of retinal ganglion cell degeneration // Exp. Eye Res. 2016. V. 143. P. 28–38.

Osborne A., Sanderson J., Martin K.R. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factor on human retinal ganglion cells // Stem Cells (Dayton, Ohio). 2018. V. 36. P. 65–78.

Ovando-Roche P., West E.L., Branch M.J., Sampson R.D., Fernando M., Munro P., Georgiadis A., Rizzi M., Kloc M., Naeem A., Ribeiro J., Smith A. J., Gonzalez-Cordero A., Ali R.R. Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields // Stem Cell Res. Ther. 2018. V. 9. P. 156.

Pinzón-Duarte G., Kohler K., Arango-González B., Guenther E. Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture // Vision Res. 2000. V. 40. P. 3455–3465.

Rattner A., Smallwood P.M., Williams J., Cooke C., Savchenko A., Lyubarsky A., Pugh E.N., Nathans J. A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival // Neuron. 2001. V. 32. P. 775–786.

Reichman S., Slembrouck A., Gagliardi G., Chaffiol A., Terray A., Nanteau C., Potey A., Belle M., Rabesandratana O., Duebel J., Orieux G., Nandrot E.F., Sahel J.A., Goureau O. Generation of storable retinal organoids and retinal pigmented epithelium from adherent human iPS cells in xeno-free and feeder-free conditions // Stem Cells. 2017. V. 35. P. 1176–1188.

Reichenbach A., Bringmann A. New functions of Muller cells // Glia. 2013. V. 61. P. 651–678.

Reidel B., Orisme W., Goldmann T., Smith W. C., Wolfrum U. Photoreceptor vitality in organotypic cultures of mature vertebrate retinas validated by light-dependent molecular movements // Vision Res. 2006. V. 46. P. 4464–4471.

Reinbold R. Organotypic differentiation of the eye of the chick embryo *in vitro* // C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 1954. V. 148. P. 1493–1495.

Sassoè-Pognetto M., Feigenspan A., Bormann J., Wässle H. Synaptic organization of an organotypic slice culture of the mammalian retina // Vis. Neurosci. 1996. V. 13. P. 759–771.

Schutgens F., Verhaar M.C., Rookmaaker M.B. Pluripotent stem cell-derived kidney organoids: An *in vivo*-like *in vitro* technology // Eur. J. Pharmacol. 2016. V. 790. P. 12–20.

Sengupta A., Chaffiol A., Mace E., Caplette R., Desrosiers M., Lampic M., Forster V., Marre O., Lin J.Y., Sahel J.A., Picaud S., Dalkara D., Duebel J. Red-shifted channel rhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina // EMBO Mol. Med. 2016. V. 8. P. 1248–1264.

Shafaie S., Hutter V., Cook M.T., Brown M.B., Chau D.Y.S. *In vitro* cell models for ophthalmic drug development applications // Biores. Open Access. 2016. V. 5. P. 94–108.

Smedowski A., Pietrucha-Dutczak M., Maniar R., Ajeleti M., Matuszek I., Lewin-Kowalik J. FluoroGold-labeled organotypic retinal explant culture for neurotoxicity screening studies // Oxid. Med. Cell Longev. 2018. V. 13. P. 2487473.

Thanos S., Thiel H.J. Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells *in vitro* // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1990. V. 228. P. 369–376.

Thangaraj G., Greif A., Layer P.G. Simple explant culture of the embryonic chicken retina with long-term preservation of photoreceptors // Exp. Eye Res. 2011. V. 93. P. 556–564.

Victorov I.V., Lyjin A.A., Aleksandrova O.P. A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus // Brain Res. Brain Res. Protoc. 2001. V. 7. P. 30–37.

Willbold E., Layer P.G. A hidden retinal regenerative capacity from the chick ciliary margin is reactivated *in vitro*, that is accompanied by down-regulation of butyrylcholinesterase // Eur. J. Neurosci. 1992. V. 4. P. 210–220.

Wolburg H., Willbold E., Layer P.G. Müller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly *in vitro* only in the presence of marginal pigmented epithelium // Cell Tissue Res. 1991. V. 264. P. 437–451.

Yin X., Mead B.E., Safaee H., Langer R., Karp J.M., Levy O. Engineering stem cell organoids // Cell Stem Cell. 2016. V. 18. P. 25–38.

Yanai A., Laver C.R., Gregory-Evans C.Y., Liu R.R., Gregory-Evans K. Enhanced functional integration of human photoreceptor precursors into human and rodent retina in an *ex vivo* retinal explant model system // Tissue Eng. Part A. 2015. V. 21. P. 1763–1771.

Zhang S.S., Fu X.Y., Barnstable C.J. Tissue culture studies of retinal development // Methods. 2002. V. 28. P. 439–447.

Zhang C., Lam T.T., Tso M.O. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury // Exp. Eye Res. 2005. V. 81. № 6. P. 700–709.

Organotypic Culturing as a Way of Studying of Recovery Opportunities of the Retina of Vertebrate Animals and Human

Yu. P. Novikova[1, *], V. A. Poplinskaya[1], and E. N. Grigoryan[1, **]

[1]*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: info@idbras.ru*

***e-mail: leonore@mail.ru*

Received February 12, 2019; revised June 17, 2019; accepted June 30, 2019

In the review using literature and our own data the information about experiments held at different time with application of organotypic culturing of the retina of vertebrate animals and human is provided. The method allows to maintain retinal structure and viability, simulate a number of its pathological states, watch for processes of development, regeneration, reconstruction, and loss and regrowth of neural processes. Besides, the organotypic culturing gives opportunities to affect mentioned processes by various regulatory factors as well as toxic or protecting agents in strictly specified concentrations and in controlled conditions. Special attention is paid to the behavior of retinal pigment epithelial cells, photoreceptor cells, Mullerian glial cells, ganglion cells and their axons, another words to those cell populations which are often affected in cases of various pathological states and diseases of the retina. A separate section is devoted to actively developing today the production and culturing of so called retinal organoids. The direction promises opportunities for retinal cells' transplantation, for gene therapy experiments and testing of ophthalmo-pharmacological drugs.

Keywords: vertebrates, retina, culturing *in vitro*, regeneration, reconstruction, organoids

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 51–63

ОБЗОРЫ

УДК 612.67;591.3;611.81;592/599

РАЗВИТИЕ И СТАРЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2020 г. С. Я. Амстиславский[a, b, *], Е. Ю. Брусенцев[a], О. М. Петрова[a, b], В. А. Напримеров[a, c], А. Л. Левинсон[b, d]

[a]ФГБНУ "ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН", пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

[b]ФГАОУ ВО "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (НГУ), ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

[c]ФГАОУ ВО "Новосибирский государственный аграрный университет" (НГАУ), ул. Добролюбова, 160, Новосибирск, 630037 Россия

[d]Новосибирский центр репродуктивной медицины, ул. Героев Революции, 3, Новосибирск, 630037 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2019 г.
После доработки 11.09.2019 г.
Принята к публикации 20.09.2019 г.

Представлен обзор данных, касающихся развития репродуктивной системы млекопитающих. Особое внимание уделено гормональным и социальным факторам, влияющим на процесс полового созревания млекопитающих, а также видам, для которых характерно раннее половое созревание. Наряду с этим, отмечаются возрастные изменения репродуктивной системы у самцов и самок. Подробно освещены онтогенетические аспекты развития репродуктивной системы у человека. Отмечены особенности применения репродуктивных технологий в зависимости от возраста.

Ключевые слова: репродуктивная система, половое созревание, млекопитающие, старение, репродуктивные технологии

DOI: 10.31857/S0475145020010073

ВВЕДЕНИЕ

Большое разнообразие видов млекопитающих дает возможность наблюдать многообразие репродуктивных механизмов и стратегий. Между тем, имеются фундаментальные различия в онтогенезе мужской и женской репродуктивной системы (Vidal, 2016; Picut et al., 2017). Целью обзорной статьи является сравнение базовых механизмов созревания и старения репродуктивной системы самок и самцов, общих для разных видов млекопитающих. В качестве иллюстрации половых различий созревания этой важнейшей системы представлены экспериментальные данные по горностаю, у которого самки способны к продуктивному спариванию еще в период вскармливания (Амстиславский и др., 1994). Несмотря на то, что феномен ювенильного полового созревания у горностая и длиннохвостой ласки открыт достаточно давно (Wright, 1963; King, Moody, 1982; Терновский, 1983), механизмы этого явления пока не раскрыты, а других видов млекопитающих со столь ранним половым созреванием самок до сих пор не обнаружено. Между тем, достаточно много исследований посвящено влиянию социальных воздействий, осуществляемых, в частности, через феромоны, а также ксенобиотиков и других факторов на онтогенез мужской и женской репродуктивной системы (Амстиславский, Ерошенко, 2000; Amstislavsky et al., 2004; Petrulis, 2013; Liberles, 2014). Анализ современных представлений о роли этих факторов в развитии репродуктивной системы млекопитающих в зависимости от пола также входит в задачи данного обзора. Старение репродуктивной системы имеет видовую специфику у разных видов животных, хотя имеются базовые различия характера старения репродуктивной системы самцов и самок (Johnson et al., 1986; Gougeon et al., 1994; Begueria et al., 2014; Duncan et al., 2017). Загадочным и малоизученным явлением является сохранение репродуктивных способностей и отсутствие снижения репродуктивного потенциала с возрастом, что характерно для голых землекопов (Buffenstein, 2008; Ma, Gladyshev, 2017). Изучение особенностей функционирования репродуктивной системы у разных видов млекопитающих, несомненно, представляет интерес в эволюционном плане, но также может явиться источником идей по развитию методов сохранения и восстановления фертильности. Отдельный раздел обзора посвящен обзору работ по

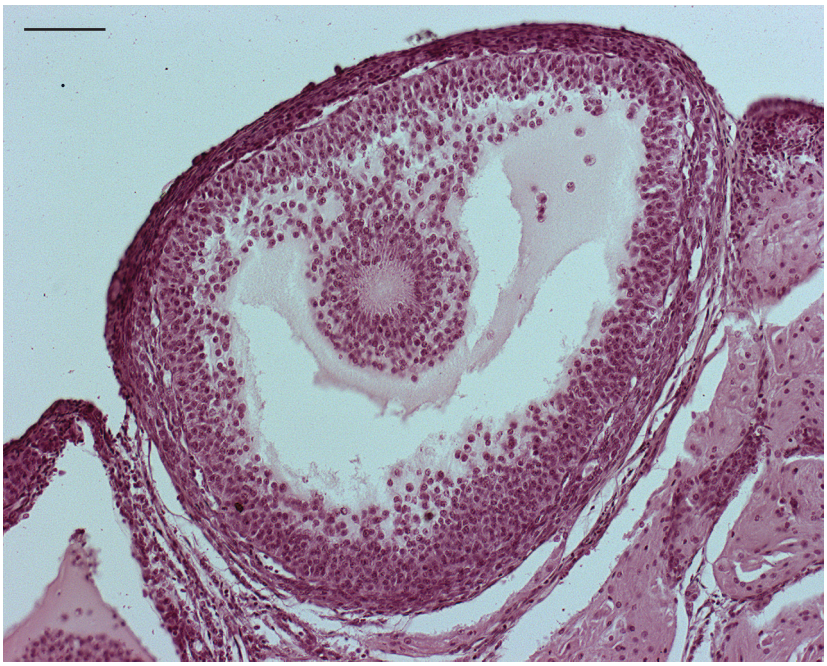

Рис. 1. Преовуляторный фолликул из яичника ювенильной самки горностая в возрасте 33 дней. Масштаб – 100 мкм. Окраска гематоксилин и эозин. Фото С.Я. Амстиславского.

созреванию, функционированию и старению репродуктивной системы человека, а также методам увеличения периода активности мужской и женской половой системы. Обсуждение современных подходов восстановления и сохранения фертильности и репродуктивного потенциала, основанных на вспомогательных репродуктивных технологиях, является главной целью этой обзорной статьи.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ ЖЕНСКОЙ И МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Функциональной единицей женской репродуктивной системы млекопитающих является фолликул яичника, в котором и происходит оогенез (Peters, McNatty, 1980). Именно в фолликуле находится ооцит, окруженный питающими и поддерживающими его гранулезными клетками (рис. 1), которые также осуществляют гормональную функцию, пара- и аутокринную регуляцию (Peters, McNatty, 1980; Senger, 2003). Сперматогенез и спермиогенез, то есть образование и созревание мужских гамет происходит у млекопитающих в извитых семенных канальцах семенников, а завершается в эпидидимисе (Senger, 2003). Именно в семенниках, в извитых канальцах, находятся сперматогонии, из которых в дальнейшем образуются сперматозоиды. Там же, в извитых канальцах, в тесном контакте со сперматогониями и сперматидами, находятся клетки Сертоли, выполняющие регуляторные и защитные функции (Senger, 2003; Neto et al., 2016).

Развитие половой системы у самок и самцов млекопитающих существенным образом различается. Так у самок сформирован пул первичных фолликулов уже в перинатальный период; ооциты у исследованных видов млекопитающих в не начавших еще развиваться под действием гонадотропных гормонов примордиальных фолликулах, находятся на стадии профазы I мейоза (Peters, McNatty, 1980; Berek, 2002; Leung, Adashi, 2018). Например, у мышей больше всего фолликулов на третьей неделе после рождения, потом начинаются волны атрезии и к моменту окончания периода вскармливания у мышей остается гораздо меньше фолликулов, чем было изначально (Peters, McNatty, 1980). Сходная ситуация и у других млекопитающих, в частности, у человека (Berek, 2002).

В отличие от репродуктивной системы самок млекопитающих, половая система самцов имеет свои особенности, тесно связанные с работой нейроэндокринной системы (Van der Molen et al., 1979; Senger, 2003). Сперматогенез у них начинается только после полового созревания, так как у новорожденных и неполовозрелых самцов гормональный статус препятствует этому процессу и сперматогонии находятся в пассивном “спящем” состоянии (Van der Molen et al., 1979). При этом половые гормоны, которые начинают активно продуцироваться в пубертатный период, оказывают воздействие на клетки Сертоли, участвующие в

поддержании нормального созревания и дифференцировки сперматозоидов (Fritz, 1978).

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНЫХ И СОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА СОЗРЕВАНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

На созревание репродуктивной системы млекопитающих могут воздействовать различные внешние факторы. Имеется множество указаний на то, что некоторые гормоны и гормоноподобные соединения влияют на половое созревание самок и самцов, причем влияют по-разному (Амстиславский, Ерошенко, 2000).

В работе на мышах было показано, что воздействие на мать в период беременности экзогенным эстрадиолом или ксеноэстрогеном метоксихлором ускоряет половое созревание потомков женского пола (Amstislavsky et al., 2004). К значительному ускорению полового созревания самок приводило и воздействие ксеноэстрогеном метоксихлором и в течение первых двух недель жизни мышат (Eroschenko, 1991). Аналогичные исследования на крысах показали, что воздействие на крысят синтетическим эстрогеном этинилэстрадиолом и микоэстрогеном зеараленоном приводило к ускорению их полового созревания (Kriszt et al., 2015). Некоторые данные, указывают, что фитоэстрогены сои способны ускорять половое созревание девочек, хотя, в отличие от результатов экспериментов на лабораторных животных, данные полученные на людях, более противоречивы (Kim, Park, 2012).

На темпы развития репродуктивной системы самок крыс могут оказывать воздействие различные нейротрофические факторы, такие как фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3, а также целый ряд других факторов роста, например, трансформирующий фактор роста альфа (TGF альфа), инсулиноподобный фактор роста первого типа (IGF-I), эпидермальный фактор роста (EGF) и многие другие (Ojeda et al., 1992). Таким образом, преждевременное раннее половое созревание самок, которое у горностая является нормой (Амстиславский и др., 1994), у некоторых других млекопитающих может быть вызвано гормональными воздействиями во время критических периодов развития, в частности, в пренатальном и неонатальном онтогенезе (Амстиславский, Ерошенко, 2000).

Интересно отметить, что яичники неполовозрелых самок мышей и некоторых других млекопитающих являются чувствительной мишенью для гонадотропных гормонов, применяемых с целью вызывания суперовуляции (Амстиславский и др., 1991). Идея метода суперовуляции состоит в том, чтобы при воздействии комбинацией гормонов на животных-доноров эмбрионов вызвать у них развитие максимально возможного числа фолликулов и овуляцию избыточного числа ооцитов. Ранее нами было показано, что у неполовозрелых самок мышей больше величина суперовуляторного ответа по сравнению с половозрелыми особями (Амстиславский и др., 1991) и качество ооцитов при суперовуляции у последних зависит от стадии эстрального цикла, в которую производят воздействие гормонами (Redina et al., 1994). Однако, несмотря на то, что у неполовозрелых самок мышей наблюдался существенно более сильный суперовуляторный ответ, овулировавшие ооциты были более низкого качества, чем у половозрелых самок мышей (Амстиславский и др., 1991).

Социальные воздействия также могут влиять на развитие репродуктивной системы самок у млекопитающих. Так, в частности, было обнаружено, что на созревание репродуктивной системы самок мышей могут влиять взрослые самцы и самки (Colby, Vandenberg, 1974; Drickamer, 1986; Smith et al., 1997). У многих видов млекопитающих, прежде всего, у грызунов, социальные воздействия реализуются посредством хемокоммуникации, в частности, через феромоны (Stowers, Kuo, 2015; Kiyokawa, 2017).

На мышах экспериментально были выявлены конкретные феромоны, ускоряющие половое созревание молодых самок (Nishimura et al., 1989; Novotny et al., 1999). На мохноногих хомячках было подтверждено ускорение развития половой системы у самок, если их содержать вместе со взрослым самцом и замедление развития, если самок содержать в однополой группе, что возможно также обусловлено действием феромонов (Gudermuth et al., 1992).

Присутствие других особей, либо их феромонов, также может влиять на созревание половой системы самцов мышей (Vandenbergh, 1971; Koyama, 2004). Так, на сперматогенез мышей могут оказывать воздействие феромоны как самцов, так и самок, что, по всей видимости, реализуется через нейроэндокринную систему (Vandenbergh, 1971; Koyama, 2004). В частности, на грызунах было показано, что 2,5-диметилпиразин вырабатываемый самками, содержащимися в однополой группе, не только подавляет эстральный цикл (эффект Ли-Бута) у самок мышей (Ma et al., 1998), но и угнетает репродуктивную активность самцов: снижает массу семенных пузырьков и предстательной железы, концентрацию тестостерона в плазме крови крыс (Yamada et al., 1993). С другой стороны, соединения, содержащиеся в моче самок, часто оказывают стимулирующее действие на репродуктивную систему самцов, в частности, через повышение уровня гонадотропных гормонов гипофиза (Maruniak, Bronson, 1976).

Развитие половой системы самцов во многом зависит от правильной работы эндокринной системы

(Van der Molen et al., 1979). Многие вещества, выделяющиеся при промышленном производстве, обладают антиандрогенными и эстрогеноподобными свойствами, и, накапливаясь в организме, оказывают негативное влияние на сперматогенез (Амстиславский, Ерошенко, 2000). В частности, различные химические соединения, используемые как в сельском хозяйстве, например, пестициды, так и при производстве органических полимеров могут негативно влиять на гормональный статус, и, как следствие, на сперматогенез различных видов млекопитающих (Mehrpour et al., 2014; Di Nisio, Foresta, 2019). Различные отходы промышленности, загрязняющие почвы и водоемы, например, фталаты, побочные продукты, образующиеся при синтезе фталевого ангидрида, которые относятся к ксеноэстрогенам, могут приводить к демаскулинизации, выражающейся в подавлении производства андрогенов, ослаблении действия тестостерона, а также снижении качества сперматозоидов, что, в конечном счете, приводит к бесплодию самцов грызунов (Savchuk et al., 2015). Также, нарушение продукции андрогенов с последующим нарушением сперматогенеза вызывают перфтороктановая кислота и перфтороктановый сульфонат, которые используются в промышленности при получении фторполимеров (Zhang et al., 2014). Аналогичное воздействие на репродуктивную систему самцов грызунов может оказывать бисфенол А, который по химической формуле близок к эстрогену и используется в промышленности при получении пластмасс (Kobayashi et al., 2010).

СТАРЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Общими признаком старения репродуктивной системы у самок млекопитающих являются снижение фолликулов в яичниках вплоть до полного их исчезновения. Наряду с этим, снижается качество ооцитов, в них происходят протеомные и митохондриальные изменения, больше становится активных форм кислорода (Babayev et al., 2016; Duncan et al., 2017). Как было показано в экспериментах на самках мышей, замедление метаболизма при помощи рапамицина продлевает функционирование яичников (фолликулогенез, овуляция) даже у стареющих животных (Dou et al., 2017). Также, введение различных антиоксидантов при культивировании *in vitro* улучшает митохондриальную активность, экспрессию генов и развитие эмбрионов полученных от старых самок мышей (Silva et al., 2015). У видов с пренебрежимым старением, например, у голых землекопов, есть свои особенности. Репродуктивная система у них функционирует в течение всей жизни и фертильность практически не падает, в том числе и по причине замедленного метаболизма (Buffenstein, 2008).

У стареющих самок животных сложнее получить потомство естественным путем, чем в молодом возрасте. В частности, на крупном рогатом скоте (КРС) было обнаружено снижение компетентности ооцитов к развитию у старых коров (Malhi et al., 2007; Dias et al., 2014). Между тем, от стареющих самок животных, при снижении их способности к естественному размножению, вполне возможно получить полноценные эмбрионы при помощи метода суперовуляции и других репродуктивных технологий (Амстиславский и др., 1991; Dias et al., 2014; Magata et al., 2019).

У стареющих самцов продуцируется меньше сперматозоидов, они менее подвижные, больше становится дефектных форм, уменьшается площадь семенных канальцев, а также возрастает интенсивность свободно-радикального окисления, что вызывает изменение в структуре сперматозоидов и их ДНК (Salomon, Benfato, 2018; Tesi et al., 2018). Генетический материал сперматозоидов подвергается изменениям по мере старения самцов (Ozkosem et al., 2015), но благодаря онкосупрессору p53, который также играет важную роль и в процессе сперматогенеза, дефектные сперматозоиды элиминируются (Yin et al., 1998).

Между тем, общеизвестно, что от стареющих самцов разных видов млекопитающих сложно получить потомство естественным путем из-за описанных выше причин. Преодолеть этот возрастной барьер помогает ИО – искусственное осеменение. В свою очередь, как было показано на собаках, изменение параметров семени у старых особей может негативно повлиять и на фертильность после ИО (Tesi et al., 2018). Как в репродуктивной медицине, так и при работе со стареющими самцами других млекопитающих продемонстрировано успешное применение метода ИКСИ – интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (Ohta et al., 2009; Zini et al., 2017; Magata et al., 2019). Однако, данная процедура может оказывать влияние на экспрессию некоторых генов (Arias et al., 2015). Также перспективным направлением при работе со старыми самцами является культивирование *in vitro* сперматогониальных стволовых клеток, взятых в молодом возрасте и поддерживаемых в культуре *in vitro*, что было проверено в опытах на мышах (Schmidt et al., 2011). Качество семени старых самцов также можно повысить и при помощи специальной диеты. Как было показано в экспериментах на крысах, добавление к стандартному рациону экстракта корейского красного женьшеня улучшает сперматогенез у стареющих крыс (Kopalli et al., 2017).

ПАРАДОКС РАННЕГО ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ САМОК У ГОРНОСТАЯ

Горностай (*Mustela ermine*) является представителем семейства куньих и широко распростра-

нен в палеарктической зоне Евразии и Северной Америки (Wright, 1963; Терновский, 1983). Этот небольшой по размеру зверек, так же, как и родственный ему вид длиннохвостой ласки (*Mustela frenata*) демонстрирует раннее половое созревание самок, у которых еще во время периода вскармливания появляются признаки эструса и способность к успешному спариванию (Wright, 1963; Терновский, 1983; Амстиславский и др., 1994).

Для горностая (*Mustela erminea*) характерен длительный период облигатной диапаузы (Терновский, 1983; Амстиславский и др., 1994; Amstislavsky, Ternovskaya, 2000). Кроме горностая облигатная диапауза характерна и для некоторых других представителей куницеобразных (Wright, 1963; Amstislavsky, Ternovskaya, 2000). В настоящее время, эмбриональная диапауза была обнаружена у 130 видов млекопитающих, относящихся к самым разным зоологическим таксонам (Renfree, Fenelon, 2017), однако, лишь у горностая и длиннохвостой ласки она удивительным образом сочетается с феноменом раннего полового созревания самок (Wright, 1963; Терновский, 1983; Амстиславский и др., 1994).

Для самок горностая характерно раннее половое созревание, еще в период их вскармливания в гнезде; возможность оплодотворения таких ювенильных самок взрослыми самцами была подтверждена многолетними исследованиями Д.В. Терновского и Ю.Г. Терновской на разводимой в неволе популяции горностая (Терновский, 1983). Нами было впервые показано, что такое спаривание взрослых самцов с ювенильными самками провоцирует у них овуляцию ооцитов, при этом нами было документировано преимплантационное развитие эмбрионов вплоть до их имплантации (Амстиславский и др., 1994). Исследование яичников таких ювенильных самок показало наличие активного фолликулогенеза, при этом имели и преовуляторные фолликулы готовые к овуляции (рис. 1). Причем экзогенные гормональные воздействия влияют на характер овуляции и развитие эмбрионов у ювенильных самок горностая (Амстиславский и др., 1997). Полевые исследования, проведенные в Новой Зеландии, также указывают на то, что ювенильные самки горностая оплодотворяются взрослыми самцами еще в гнезде в период вскармливания (King, Moody, 1982). Переход эмбриона в матку у горностая происходит лишь на 11-й день после спаривания (Амстиславский и др., 1994), тогда как у большинства других видов млекопитающих это осуществляется с третьего по восьмой день (Austin, 1982). После попадания в матку эмбрионы могут не имплантироваться в течение 8–9 мес. При этом, во время диапаузы зародыши горностая увеличиваются в диаметре примерно в 10 раз (Амстиславский и др., 1994).

ГОЛЫЕ ЗЕМЛЕКОПЫ И ПАРАДОКС СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ С ВОЗРАСТОМ

Современные представления о биологических основах и типах старения во многом основаны на трудах Калеба Финча. Финч (Finch, 1990) выделил три типа старения: быстрое (rapid), постепенное (gradual) и пренебрежимое (negligible). Особый интерес для изучения старения репродуктивной системы представляют виды животных с пренебрежимым старением. Их идентифицируют по следующим критериям: отсутствие возрастания смертности в зависимости от возраста; отсутствие снижения репродуктивного потенциала после полового созревания; отсутствие снижения физиологических способностей и резистентности к заболеваниям с возрастом (Finch, 1990). По современным представлениям, существует лишь несколько видов млекопитающих, которые удовлетворяют некоторым, хотя не всем критериям пренебрежимого старения. Это, прежде всего, голые землекопы (*Heterocephalus glaber*) представители отряда грызунов, которых изучают в лабораторных условиях и аспекты их биологии, в том числе репродуктивной, достаточно хорошо исследованы; голые землекопы удовлетворяют некоторым критериям пренебрежимого старения (Buffenstein, 2008; Dhillon, Denu, 2017; Lagunas-Rangel, Chavez-Valencia, 2017; Ma, Gladyshev, 2017; Manskikh et al., 2017; Valenzano et al., 2017; Sumbera, 2019). Другими видами млекопитающих, которые условно могут быть отнесены к животным с пренебрежимым старением, являются гренландский кит (*Balaena mysticetus*) и, возможно, африканский слон (*Loxodonta africana*), а также некоторые виды летучих мышей и слепышей (Seim et al., 2013; Tacutu et al., 2013; Ma, Gladyshev, 2017), которые существенно менее исследованы, чем голые землекопы в плане их репродукции и продолжительности жизни. Таким образом, голые землекопы являются интересным объектом для изучения процессов старения, в том числе и репродуктивной системы, естественные долгожители, максимальная продолжительность жизни которых составляет 28 лет *ex situ*, что резко отличает данный вид от млекопитающих сходного размера (Buffenstein, 2008). Эти животные отличаются от остальных грызунов более поздним половым созреванием и более длительной беременностью (Jarvis, 1991; Smith et al., 1997). Голые землекопы являются эусоциальными животными с крайней формой кооперативного размножения; в репродукции участвует только одна доминантная самка и от одного до трех самцов (Jarvis, 1991). При этом доминантные особи участвуют в размножении на протяжении всей своей жизни, не теряя фертильности (Buffenstein, 2008; Valenzano et al., 2017; Sumbera, 2019). Так доминантная самка за 24 года своей жизни способна оставить до 900 потомков. После ги-

бели доминантной самки ее место занимает другая, наиболее сильная в конкурентной борьбе (Jarvis, 1991). Таким образом, голые землекопы подходят, по крайней мере, под один из критериев пренебрежимого старения – отсутствие снижения репродуктивного потенциала после полового созревания. Однако, у самцов голых землекопов в возрасте 20 и более лет были обнаружены нейроэндокринная карцинома и аденокарцинома, что опровергает гипотезу об отсутствии у этого вида патологий данного типа (Delaney et al., 2016). В связи с чем данный вид не удовлетворяет критерию отсутствие снижения физиологических способностей и резистентности к заболеваниям с возрастом.

Доминантная самка подавляет фертильность других особей, при этом, как показали исследования, не столько при помощи феромонов (Faulkes, Abbott, 1993), но посредством других механизмов, опосредованных через социальные взаимодействия, которые могут приводить к подавлению способности к размножению (Faulkes, Abbott, 1996; Smith et al., 1997). Физиологически такое подавление репродуктивной функции не участвующих в размножении самок может быть реализовано через активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, поскольку показано, что у них уровень кортизола в моче выше, чем у доминантных самок, участвующих в размножении (Faulkes, Abbott, 1996).

РАЗВИТИЕ И СТАРЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

У человека миграция первичных половых клеток из желточного мешка в гонады плода начинается с 7–8 нед. беременности и к 16 нед. в яичниках определяются ооциты. Максимальным число половых клеток становится к 20–22 нед. беременности, когда их насчитывается около 7 млн, в дальнейшем происходит массивная атрезия, и к моменту родов в яичниках насчитывается всего около 1 млн яйцеклеток. К началу менструальной функции в яичниках остается лишь от 250 до 500 тыс. ооцитов (Faddy, Gosden, 1995; Berek, 2002). По достижении же возраста 50 лет их остается всего лишь около 1500 (Faddy, Gosden, 1995).

Оптимальным репродуктивным возрастом для женщины считается период с 25 до 35 лет. Начиная примерно с 32 лет фертильность женщин постепенно угасает, что проявляется в снижении числа беременностей и родов и увеличением количества выкидышей у женщин старше 35 лет (Steiner, Jukic, 2016). Тем не менее, менструальная функция сохраняется у женщин намного дольше. Часто понятия менструальной и репродуктивной функции воспринимаются как синонимы, однако, это не совсем так. Одной из основных причин угасания фертильности является изменение работы яичников, а точнее изменения в числе и качестве яйцеклеток, при этом циклические изменения в яичнике, собственно овуляция, сохраняется в течение довольно длительного времени. Вопрос сохранения и восстановления женской репродуктивной функции является актуальным. Не смотря на развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), направленных на женское репродуктивное здоровье (Sharma et al., 2018), возможности сохранения репродуктивных функций у женщин старшей возрастной категории ограничены и по сей день.

С момента становления менструальной функции происходит выход фолликулов из состояния покоя, начинается их рост (Faddy, Gosden, 1995; Berek, 2002). Эти процессы приводят к появлению доминатного фолликула и заканчиваются овуляцией. Фолликулогенез можно разделить на следующие стадии: 1 – выход из состояния покоя, формирование пула растущих фолликулов, 2 – базальный рост до стадии малого антрального фолликула, 3 – селекция и созревание доминантного фолликула. Первые два этапа продолжаются у человека около 200 дней и являются гормон-независимыми, то есть не управляются гормонами гипофиза (в первую очередь ФСГ) напрямую, а регулируются внутренними факторами яичника, многие из которых окончательно не определены (Faddy, Gosden, 1995; McGee, Hsueh, 2000; Adhikari, Liu, 2009).

В качестве возможного механизма выхода фолликулов из состояния покоя предложена теория “латеральной спецификации”, которая предполагает, что дифференциация фолликулов начинается с потери боковых контактов с соседними фолликулами (Baker, Spears, 1999). Показано существование различных супрессорных факторов, удерживающих фолликулы в состоянии покоя, таких как *PTEN* ген-супрессор опухолей, сигнальный путь *Hippo*, отвечающий за ограничение роста и поддержание размера органов, факторов транскрипции *FOXO* (Zhao et al., 2011; Liu-Chittenden et al., 2012). Выход фолликулов из состояния покоя происходит непрерывно в течение репродуктивного периода у женщины, но не является равномерным. Так в возрасте 24–25 лет ежедневно начинают дифференцироваться около 50 примордиальных фолликулов, в 34–35 лет около 15 фолликулов, а в 44–45 лет только около 3 фолликулов (Faddy, Gosden, 1995).

Третий этап продолжается от 14 до 30 дней и регулируется гормонами гипофиза (ФСГ и ЛГ), что на практике используется при индукции суперовуляции в программах ВРТ. Применение индукции суперовуляции не истощает овариальный резерв, так как воздействует только на фолликулы, достигшие соответствующей стадии, предотвращая атрезию большого числа антральных фол-

ликулов в ходе селекции доминантного (Назаренко, Смирнова, 2004).

За жизнь у женщины происходит около 400–500 овуляций (Berek, 2002). Однако, у человека, лишь очень небольшой процент фолликулов яичника овулирует. Большинство же фолликулов в процессе развития подвергается атрезии, которая регулируется тонким взаимодействием про- и антиапоптотических факторов (McGee, Hsueh, 2000). В возрасте старше 38 лет к этому процессу прибавляется уменьшение числа примордиальных фолликулов, что значительно ускоряет процесс угасания функции яичников (Gougeon et al., 1994).

Большинство исследователей сходится во мнении, что угасание репродуктивной функции у женщин начинается в возрасте 36–40 лет, при этом менструальная функция сохраняется в среднем до 50 лет. Угасание репродуктивной функции проявляется снижением частоты наступления беременности, увеличением количества ранних потерь беременности по причине хромосомных аномалий, выявляемых у эмбрионов. Анеуплоидии, наиболее распространенные и клинически значимые хромосомные аномалии, возникают в основном из-за ошибок сегрегации во время мейоза и тесно связаны с возрастом женщин (Demko et al., 2016). Так трисомии встречаются в 35% всех клинически признанных беременностей у женщин старше 40 лет, и лишь только в 2–3% – у женщин в возрасте от 20 лет (Hassold, Hunt, 2001). Другие исследования, в частности, полный анализ кариотипа первого полярного тела, также указывают на низкую частоту анеуплоидии (3%) в ооцитах молодых фертильных женщин (Fragouli et al., 2009). Исследования хромосомного набора эмбрионов, при выполнении преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) в программах ВРТ с использованием полногеномных методов (aCGH, NGS), показали, что у женщин со средним возрастом около 40 лет общий уровень аномалий ооцитов составил 70%, а аномалии метафазы-II преобладали над аномалиями метафазы-I, частота анеуплоидии составляет 50 и 40.3% соответственно (Fragouli et al., 2011). Причиной этого могут быть дефекты мейотического веретена, которые довольно часто встречаются у женщин в возрасте 40–45 лет (Battaglia et al., 1996).

В настоящее время единственным эффективным методом помощи в реализации репродуктивной функции женщинам старшей возрастной группы является донорство ооцитов, полученных у женщин моложе 35 лет. Индукции суперовуляции и получение ооцитов у пациенток старшей возрастной группы также возможны, однако на практике количество яйцеклеток резко снижено, сопровождается аномальным оплодотворением и отсутствием бластуляции (Боярский, 2005).

Долгое время считалось, что ооциты в организме женщины не обновляются, по завершении формирования гонад в эмбриональном и перинатальном периоде, а лишь расходуются в течение жизни. Подобное описание называется теорией “хранения”. Слабым местом этой теории представляется необходимость существования сформированных ооцитов в течение десятков лет до их использования с риском накопления изменений под воздействием факторов внешнего воздействия. Так же теория “хранения” ооцитов не объясняет довольно резкого ухудшения качества ооцитов в возрасте около 38–40 лет (Bukovsky, Caudle, 2012).

В 1995 году было показано, что фолликулярное обновление яичников существует у взрослых женщин (Bukovsky et al., 1995). Этой же группой исследователей было продемонстрировано, что бипотентные овариальные стволовые клетки у взрослых женщин происходят из оболочки яичника и, мигрируя в строму яичника, превращаются в гнезда гранулезных клеток и ооциты, образуя новые фолликулы (Bukovsky et al., 2004). По мнению авторов, управление фолликулярным обновлением осуществляется иммунной системой, статус которой изменяется в возрасте около 38 лет, что приводит к прекращению нео-оогенеза и, соответственно, к угасанию репродуктивной функции, проявляющемуся в накоплении генетических изменений в яйцеклетках (Bukovsky, Caudle, 2012).

Была также проведена серия работ по нео-оогенезу *in vitro* из овариальных стволовых клеток, полученных из яичников без фолликулов у женщин в постменопаузе и с ПНЯ – преждевременной недостаточностью яичников (Bukovsky, Virant-Klun, 2007). Несомненно, подобные исследования имеют огромный потенциал для создания методов по сохранению и восстановлению репродуктивной функции у женщин с онкологическими заболеваниями и ПНЯ (Baas, 2012).

На сегодняшний день наиболее эффективным и распространенным способом сохранения фертильности у женщин является витрификация ооцитов, позволяющая сохранить репродуктивный потенциал при “отложенном материнстве” или выявлении онкологических заболеваний, требующих цитотоксической терапии. Недостатком витрификации ооцитов является невозможность ее применения при уже развившейся недостаточности яичников и неэффективность в старшем репродуктивном возрасте при накоплении генетических изменений в яйцеклетках. В странах Европы и Америки, сохранение женской репродуктивной функции с помощью витрификации ооцитов используется все шире, и носит название “social freezing” (Амстиславский и др., 2015). Однако в России этот подход применяется крайне редко, в первую очередь из-за низкой информированности населения.

Тем не менее ученые не оставляют попыток найти возможности восстановления репродуктивной функции у женщин с ПНЯ. Так в 2013 году группой японских исследований описана методика “активации фолликулов” с помощью хирургического забора яичниковой ткани с последующей ее фрагментацией и реимплантацией в ткань второго яичника (Kawamura et al., 2013). Фрагментация овариальной ткани с ее последующей реимплантацией приводит к инактивации сигнального пути *Hippo*, в результате наблюдается выход первичных фолликулов из “состояния покоя” без фармакологического воздействия. Благодаря данной технологии испанской группой авторов было достигнуто 3 спонтанных беременности у 14 пациенток (Diaz-Garcia, Pellicer, 2016). Подобный опыт по “активации фолликулов” получен и в России (Адамян и др., 2019).

Несмотря на то, что матка и маточные трубы не столь подвержены возрастным изменениям как яичники (Abdalla et al., 1997), существует повышенный риск развития многих патологических процессов, которые могут повлиять на репродуктивную функцию, что, в конечном итоге, уменьшает шансы наступления беременности и повышает вероятность осложнений (Winkler, 2014). К таким процессам относятся воспалительные заболевания органов малого таза, аденомиоз, полипы и гиперплазия эндометрия, миома тела матки, риск развития которых возрастает с возрастом (Winkler, 2014).

Многие исследования показывают, что поздняя беременность чаще сопровождается осложнениями (Kahveci et al., 2018). В 2015 году группа исследователей из Израиля показала, что частота гестационного диабета и гестационной гипертензии была значительно выше у женщин старше 35 лет и достоверно увеличивалась с возрастом (Schimmel et al., 2015). Помимо этого, беременность у женщин старшего репродуктивного возраста чаще сопровождается преэклампсией (Duckitt, Harrington, 2005), повышенной частотой кесарева сечения и преждевременными родами (Baser et al., 2013). Подобные осложнения описаны и для случаев беременности, которые были достигнуты с использованием методов ВРТ у женщин старшей возрастной группы: гестационный сахарный диабет, гестационная гипертензия (Zhu et al., 2016), а также преждевременные роды и другие отклонения (Pandey et al., 2012). При существовании патологии матки или заболеваний, не позволяющих вынашивать беременность, решением может быть использование суррогатного материнства (Brinsden, 2003).

Некоторые исследователи пишут о значительном увеличении риска неблагоприятных исходов беременности у возрастных матерей, включая материнскую смерть, а также риск мертворождения и перинатальную смертность (Laopaiboon et al., 2014). Однако другие работы опровергают эти данные, объясняя отсутствие неблагоприятных исходов хорошей дородовой помощью и постоянным мониторингом беременности, а также своевременным предотвращением беременности в случаях диагностики серьезных патологий плода (Schimmel et al., 2015).

Мужская репродуктивная система менее подвержена возрастным изменениям, чем женская (Begueria et al., 2014). Это связано с сохранением в мужских половых железах сперматогониев, по некоторым данным до 90 лет (Johnson et al., 1986), которые способны самообновляться и восстанавливать структуру сперматогенного эпителия при его повреждениях (Johnson, 1986). Значительная часть сперматоцитов гибнет в процессе мейотического деления, что является частью механизма осуществления элиминации мужских половых клеток с хромосомными нарушениями (Захидов, Кулибин, 2006). Однако важно добавить, что при сильной мутагенной нагрузке данный механизм элиминации может не справиться с огромным количеством мутаций, возникающих в мужских половых клетках (Захидов, Кулибин, 2006). Показано, что число мутаций возрастает с возрастом, и именно потомки отцов старшей возрастной группы имеют больший риск стать носителями таких мутаций (Kong et al., 2012).

С течением времени у мужчин выявляется изменения морфологии яичек, снижение уровня андрогенов, проявляющееся в снижении сексуальной активности (Sartorius, Nieschlag, 2009) и ухудшение качества спермы: уменьшение объема, снижение подвижности сперматозоидов, их количества и жизнеспособности, изменение морфологии сперматозоидов (Veron et al., 2018). В последнее время активно обсуждается вопрос о вкладе в изменение сперматогенеза факторов, связанных со старением организма и воздействии факторов окружающей среды, накоплении ксенобиотиков. Несомненно, ухудшение параметров эякулята приводит к невозможности сперматозоидов самостоятельно достичь яйцеклетки и осуществить оплодотворение. В таком случае для реализации репродуктивной функции применяется метод ИКСИ. Влияние отцовского возраста на целостность ДНК сперматозоидов до сих пор остается спорным вопросом. Некоторые исследователи пишут о наличии у возрастных мужчин более высокой частоты анеуплоидий и точечных мутаций, большого количества разрывов ДНК сперматозоидов, генетического импринтинга и других хромосомных аномалий (Sloter et al., 2004; Thacker, 2004). Другие же демонстрируют в своих статьях отсутствие корреляции между возрастом мужчины и частотой нарушений в целостности ДНК сперматозоидов (Winkle et al., 2009). Однако нет сомнений в том, что мужское старение, так-

же, как и женское, негативно влияет на будущую беременность и ее исход (Sartorius, Nieschlag, 2009). Таким образом, и мужской, и женский возраст играют важную роль в процессах инициации беременности, ее поддержания и исхода, а также дальнейшей жизни ребенка.

Развитие, функционирование и старение репродуктивной системы является актуальным вопросом, как для медицины, так и для сельского хозяйства и сохранения редких и исчезающих видов животных. За более чем 40 лет активного использования вспомогательных репродуктивных технологий получено много данных об особенностях гамето- и эмбриогенеза, существенно увеличились возможности по сохранению и восстановлению репродуктивной функции как человека, так и других млекопитающих, созданы банки половых клеток и эмбрионов редких видов животных. Приведенный в статье обзор данных указывает на коренное отличие в развитии женской и мужской репродуктивной системы. Если у самок большинства млекопитающих пул фолликулов сформирован уже в перинатальный период и число фолликулов и ооцитов в яичниках в течение постнатального онтогенеза непрерывно уменьшается и у стареющих самок их практически не остается, то у самцов сперматогенез начинается только после полового созревания, так как у новорожденных и неполовозрелых самцов гормональный статус препятствует этому процессу. Однако, сперматогенез у самцов большинства млекопитающих и человека продолжается и у стареющих особей. Соответственно, в отличие от самок, у самцов отсутствует “субстрат” для раннего полового созревания и сам феномен “precocious sexual maturation”, который наблюдается при некоторых воздействиях на лабораторных грызунов в пре- и неонатальном онтогенезе, а также является облигатным свойством развития у горностая, характерен для созревания именно женской репродуктивной системы. Тем не менее, в силу различных причин, естественное размножение становится затруднительным и у стареющих самцов и у самок млекопитающих. Современные репродуктивные технологии, такие как вызванная гормональными препаратами суперовуляция, ИО, ЭКО, ИКСИ, а также замораживание и последующее дозревание *in vitro* ооцитов и сперматогониальных стволовых клеток, взятых в молодом возрасте и поддерживаемых в культуре, позволяет существенно расширить “возрастную” рамку воспроизводства ценных лабораторных, сельскохозяйственных и других видов млекопитающих, а также преодолеть возрастной барьер при получении потомства у человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025 и бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0041.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Адамян Л.В., Дементьева В.О., Асатурова А.В., Назаренко Т.А. Одноэтапный хирургический метод активации функции яичников (первое клиническое наблюдение) // Проблемы репродукции. 2019. Т. 25(1). С. 97–99.

Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Воротников М.Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных. Новосибирск: Изд-во ИЦиГ, 1991. 170 с.

Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Терновская Ю.Г., Терновский Д.В. Особенности биологии размножения и развития зародышей у горностая // Зоологический журнал. 1994. Т. 73. № 11. С. 124–131.

Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Зудова Г.А., Терновская Ю.Г. Суперовуляция, вызванная введением препаратов ГСЖК у куницеобразных // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 359–366.

Амстиславский С.Я., Ерошенко В.П. Влияние экоэстрогенов на развитие репродуктивной системы млекопитающих // Онтогенез. 2000. Т. 31. С. 165–177.

Амстиславский С.Я., Кожевникова В.В., Казак Е.А., Рожкова И.Н. Перспективы репродуктивной медицины // Природа. 2015. № 11. С. 37–45.

Боярский К.Ю. Роль показателей овариального резерва при лечении бесплодия методом ЭКО-ПЭ. Лечение женского и мужского бесплодия (вспомогательные репродуктивные технологии) / Под ред. Кулакова В.И., Леонова Б.В., Кузьмичева Л.Н. М.: МИА, 2005. С. 53–60.

Захидов С.Т., Кулибин А.Ю. Усиление генетической нестабильности сперматогенной системы у ускоренно стареющих мышей SAMP1 под влиянием модельного мутагена дипина // Докл. РАН. 2006. Т. 407. С. 411–413.

Назаренко Т.А., Смирнова А.А. Индукция моно- и суперовуляции: оценка овариального резерва, ультразвуковой и гормональный мониторинг // Проблемы репродукции. 2004. № 1. С. 39–43.

Терновский Д.В. Биология размножения и развития горностая (Carnivora, Mustelidae) // Зоологический журнал. 1983. Т. 62 . № 7. С. 1097–1105.

Abdalla H.I., Wren M.E., Thomas A., Korea L. Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor // Hum. Reprod. 1997. V. 12. № 4. P. 827–829.

Adhikari D., Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles // Endocr. Rev. 2009. V. 30. P. 438–464.

Amstislavsky S., Ternovskaya Yu. Reproduction in mustelids // Animal Reprod. Sci. 2000. V. 60. P. 571–581.

Amstislavsky S.Y., Kizilova E.A., Golubitsa A.N., Vasilkova A.A., Eroschenko V.P. Preimplantation exposures of murine embryos to estradiol or methoxychlor change postnatal development // Reprod. Toxicol. 2004. V. 18. № 1. P. 103–108.

Arias M.E., Risopatron J., Sanchez R., Felmer R. Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle // Reprod. Biol. 2015. V. 15. № 1. P. 34–41.

Austin C.R. The Egg. Reproduction in Mammals. Germ Cells and Fertilization / Eds. Austin C., Short R., London, Cambridge, 1982. P. 46–62.

Baas T. Repowering the Ovary. Science-Business eXchange, 2012. P. 4–6.

Babayev E., Wang T., Szigeti-Buck K. et al. Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity // Maturitas. 2016. V. 93. P. 121–130.

Baker S.J., Spears N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance // Hum. Reprod. Update. 1999. V. 5. № 2. 153–165.

Baser E., Seckin K.D., Erkilinc S. et al. The impact of parity on perinatal outcomes in pregnancies complicated by advanced maternal age // J. Turk. Germ. Gynecol. Assoc. 2013. V. 14. № 4. P. 205.

Battaglia D.E., Goodwin P., Klein N.A., Soules M.R. Fertilization and early embryology: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly oocytes from naturally cycling women // Hum. Reprod. 1996. V. 11. № 10. P. 2217–2222.

Begueria R., Garcia D., Obradors A., et al. Paternal age and assisted reproductive outcomes in ICSI donor oocytes: is there an effect of older fathers? // Hum. Reprod. 2014. V. 29. № 10. P. 2114–2122.

Berek J.S. Novak's Gynecology. 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2002. 1432 p.

Brinsden P.R. Gestational surrogacy // Hum. Reprod. Update. 2003. V. 9. № 5. P. 483–491.

Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole/rat: insights from a success/fully aging species // J. Comp. Physiol. B. 2008. V. 178. P. 439–445.

Bukovsky A., Keenan J.A., Caudle M.R., Wimalasena J., Upadhyaya N.B., Van Meter S.E. Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis // Am. J. Reprod. Immunol. 1995. V. 33. P. 323–340.

Bukovsky A., Caudle M.R., Svetlikova M., Upadhyaya N.B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries // Reprod. Biol. Endocrinol. 2004. V. 2. P. 20.

Bukovsky A., Virant-Klun I. Adult stem cells in the human ovary // Stem Cells in Reproductive Medicine: Basic Science & Therapeutic Potential / Ed. Simon C., Pellicer A. London: Informa Healthcare. 2007. P. 53–69.

Bukovsky A., Caudle M.R. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause *in vivo*, vs. neo-oogenesis *in vitro*, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial // Reprod. Biol. Endocrinol. 2012. V. 10. P. 97.

Colby D.R., Vandenberg J.G. Regulatory effects of urinary pheromones on puberty in the mouse // Biol. Reprod. 1974. V. 11. № 3. P. 268–279.

Delaney M.A., Ward J.M., Walsh T.F. et al. Initial case reports of cancer in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) // Vet. Pathol. 2016. V. 53. № 3. P. 691–696.

Demko Z.P., Simon A.L., McCoy R.C., Petrov D.A., Rabinowitz M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening // Fertil. Steril. 2016. V. 105. № 5. P. 1307–1313.

Dhillon R.S., Denu J.M. Using comparative biology to understand how aging affects mitochondrial metabolism // Mol. Cell. Endocrinol. 2017. V. 455. P. 54–61.

Di Nisio A., Foresta C. Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on male fertility // Reprod. Biol. Endocrinol. 2019. V. 17. № 1. P. 4.

Dias F.C., Khan M.I., Adams G.P., Sirard M.A., Singh J. Granulosa cell function and oocyte competence: Superfollicles, super-moms and super-stimulation in cattle // Anim. Reprod. Sci. 2014. V. 149. № 1–2. P. 80–89.

Diaz-Garcia C., Pellicer A. Follicle activation in patients with poor ovarian response through fragmentation of the ovarian tissue. 2016. Accessed July 17, 2018. Available at: https://trialbulletin.com/lib/entry/ct-02354963

Dou X., Sun Y., Li J. et al. Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice // Aging Cell. 2017. V. 16. № 4. P. 825–836.

Drickamer L.C. Effects of urine from females in oestrus on puberty in female mice // J. Reprod. Fertil. 1986. V. 77. № 2. P. 613–622.

Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies // Bmj. 2005. V. 330. № 7491. P. 565.

Duncan F.E., Jasti S., Paulson A. et al. Age-associated dysregulation of protein metabolism in the mammalian oocyte // Aging Cell. 2017. V. 16. № 6. P. 1381–1393.

Eroschenko V.P. Ultrastructure of vagina and uterus in young mice after methoxychlor exposure // Reprod. Toxicol. 1991. V. 5. P. 427–435.

Faddy M., Gosden R. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary // Hum. Repr. 1995. V. 10. P. 770–775.

Faulkes C.G., Abbott D.H. Evidence that primer pheromones do not cause social suppression of reproduction in male and female naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) // J. Reprod. Fertil. 1993. V. 99. № 1. P. 225–230.

Faulkes C.G., Abbott D.H. The physiology of a reproductive dictatorship: regulation of male and female reproduction by a single breeding female in colonies of naked mole-rats // Cooperative Breeding in Mammals / Eds. Nancy G. Solomon, Jeffrey A. French. Omaha: Cambridge University Press, 1996. P. 302–334.

Finch C.E. Longevity, Senescence, and the Genome. Chicago. University of Chicago Press, 1990.

Fragouli E., Escalona A., Gutierrez-Mateo C. et al. Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors // Reprod. Biomed. Online. 2009. V. 19. № 2. P. 228–237.

Fragouli E., Alfarawati S., Goodall N.N. et al. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy // MHR: Bas. Sci. Reprod. Med. 2011. V. 17. № 5. P. 286–295.

Fritz I.B. Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule // Biochemical Actions of Hormones / Ed. Litwack G. New York: Academic Press, 1978. V. 5.

Gougeon A., Echochard R., Thalabard J.C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early- growing follicles in aging women // Biol. Reprod. 1994. V. 50. P. 653–663.

Gudermuth D.F., Butler W.R., Johnston R.E. Social influences on reproductive development and fertility in female Djungarian hamsters (*Phodopus campbelli*) // Horm. Behav. 1992. V. 26. № 3. P. 308–329.

Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // Nature Rev. Gen. 2001. V. 2. № 4. P. 280.

Jarvis J.U.M. Reproduction of naked mole-rats. In The Biology of the Naked Mole-Rat: Monographs in Behavior and Ecology / Ed. Sherman P.W., Jarvis J.U.M., Alexander R.D. Princeton NJ. Princeton Univ. Press, 1991. P. 384–425.

Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human // J. Androl. 1986. V. 7. P. 331–354.

Johnson L., Petty C.S., Neaves W.B. Age-related variation in seminiferous tubules in men: a stereologic evaluation // J. Androl. 1986. V. 7. P. 316–322.

Kahveci B., Melekoglu R., Evruke I.C., Cetin C. The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies // BMC Pregn. Child. 2018. V. 18. № 1. P. 343.

Kawamura K., Cheng Y., Suzuki N. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 43. P. 17474–17479.

Kim S.H., Park M.J. Effects of phytoestrogen on sexual development // Korean. J. Pediatr. 2012. V. 55. P. 265–271.

King C.M., Moody J.E. The biology of the stoat (*Mustela erminea*) in the national parks of New Zealand. IV. Reproduction // New Zealand Journal of Zoology. 1982. V. 9. P. 103–118.

Kiyokawa Y. Social odors: alarm pheromones and social buffering // Curr. Top. Behav. Neurosci. 2017. V. 30. P. 47–65.

Kobayashi K., Ohtani K., Kubota H., Miyagawa M. Dietary exposure to low doses of bisphenol a: effects on reproduction and development in two generations of C57BL/6J mice // Congenit. Anom. (Kyoto). 2010. V. 50. P. 159–170.

Kong A., Frigge M.L., Masson G. et al. Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk // Nature. 2012. V. 488. P. 471–475.

Kopalli S.R., Cha K.M., Ryu J.H. et al. Korean red ginseng improves testicular ineffectiveness in aging rats by modulating spermatogenesis-related molecules // Exp. Gerontol. 2017. V. 90. P. 26–33.

Koyama S. Primer effects by conspecific odors in house mice: a new perspective in the study of primer effects on reproductive activities // Horm. Behav. 2004. V. 46. № 3. P. 303–310.

Kriszt R., Winkler Z., Polyak A. et al. Xenoestrogens ethinyl estradiol and zearalenone cause precocious puberty in female rats via central kisspeptin signaling // Endocrinology. 2015. V. 156. P. 3996–4007.

Lagunas-Rangel F.A., Chavez-Valencia V. Learning of nature: The curious case of the naked mole rat // Mech. Ageing. Dev. 2017. V. 164. P. 76–81.

Laopaiboon M., Lumbiganon P., Intarut N. et al. Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment // BJOG: An Inter. J. Obst. Gynaecol. 2014. V. 121. P. 49–56.

Leung P., Adashi E. The Ovary. 3rd ed. Academic Press, 2018. 625 p.

Liberles S.D. Mammalian pheromones // Annu. Rev. Physiol. 2014. V. 76. P. 151–175.

Liu-Chittenden Y., Huang B., Shim J.S. et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP // Genes. Dev. 2012. V. 26. № 12. 1300–1305.

Ma S., Gladyshev V.N. Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies // Semin. Cell. Dev. Biol. 2017. V. 70. P. 190–203.

Ma W., Miao Z., Novotny M.V. Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited // Biol. Reprod. 1998. V. 59. № 6. P. 1317–1320.

Magata F., Tsuchiya K., Okubo H., Ideta A. Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows // J. Vet. Med. Sci. 2019. V. 81. № 1. P. 84–90.

Malhi P.S., Adams G.P., Mapletoft R.J., Singh J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging // Reproduction. 2007. V. 134. № 2. P. 233–239.

Manskikh V.N., Averina O.A., Nikiforova A.I. Spontaneous and experimentally induced pathologies in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) // Biochemistry (Mosc). 2017. V. 82. № 12. P. 1504–1512.

Maruniak J.A., Bronson F.H. Gonadotropic responses of male mice to female urine // Endocrinology. 1976. V. 99. P. 963–969.

McGee E., Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles // Endocrin. Rev. 2000. V. 21. P. 200–214.

Mehrpour O., Karrari P., Zamani N., Tsatsakis A.M., Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review // Toxicol. Lett. 2014. V. 230. P. 146–156.

Neto F.T., Bach P.V., Najari B.B. et al., Spermatogenesis in humans and its affecting factors // Semin. Cell. Dev. Biol. 2016. V. 59. P. 10–26.

Nishimura K., Utsumi K., Yuhara M., Fujitani Y., Iritani A. Identification of puberty-accelerating pheromones in male mouse urine // J. Exp. Zool. 1989. V. 251. № 3. P. 300–305.

Novotny M.V., Ma W., Wiesler D., Zidek L. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein // Proc. Biol. Sci. 1999. V. 266. № 1432. P. 2017–2022.

Ohta H., Sakaide Y., Wakayama T. Age- and substrain-dependent sperm abnormalities in BALB/c mice and functional assessment of abnormal sperm by ICSI // Hum. Reprod. 2009. V. 24. № 4. P. 775–781.

Ojeda S.R., Dissen G.A., Junier M.P. Neurotrophic factors and female sexual development // Front. Neuroendocrinol. 1992. V. 13. № 2. P. 120–162.

Ozkosem B., Feinstein S.I., Fisher A.B., O'Flaherty C. Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice // Redox. Biol. 2015. V. 5. P. 15–23.

Pandey S., Shetty A., Hamilton M., Bhattacharya S., Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis // Hum. Reprod. Update. 2012. V. 18. № 5. P. 485–503.

Peters H., McNatty K.P. The Ovary. A Correlation of Structure and Function in Mammals. Berkeley and Los Angeles, California: University of California Press, 1980.

Petrulis A. Chemosignals, hormones and mammalian reproduction // Horm. Behav. 2013. V. 63. № 5. P. 723–741.

Picut C.A., Ziejewski M.K., Stanislaus D. Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system // Birth. Defects. Res. 2018. V. 110. № 3. P. 190–227.

Redina O.E., Amstislavsky S.Ya., Maksimovsky L.F. Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle // J. Reprod. Fertil. 1994. V. 102. P. 263–267.

Renfree M.B., Fenelon J.C. The enigma of embryonic diapause // Development. 2017. V. 144. P. 3199–3210.

Salomon T.B., Benfato M.S. Sexual activity affects the redox profile along the aging process in male rats // Biogerontology. 2018. V. 19. № 1. P. 13–21.

Sumbera R. Thermal biology of a strictly subterranean mammalian family, the African mole-rats (*Bathyergidae, Rodentia*) – a review // J. Therm. Biol. 2019. V. 79. 166–189.

Sartorius G.A., Nieschlag E. Paternal age and reproduction // Hum. Reprod. Update. 2009. V. 16. № 1. P. 65–79.

Savchuk I., Soder O., Svechnikov K. Mono-2-ethylhexyl phthalate stimulates androgen production but suppresses mitochondrial function in mouse Leydig cells with different steroidogenic potential // Toxicol. Sci. 2015. V. 145. P. 149–156.

Schimmel M.S., Bromiker R., Hammerman C. et al. The effects of maternal age and parity on maternal and neonatal outcome // Arc. Gynecol. Obstet. 2015. V. 291. № 4. P. 793–798.

Schmidt J.A., Abramowitz L.K., Kubota H. et al. In vivo and *in vitro* aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function // Biol. Reprod. 2011. V. 84. № 4. P. 698–706.

Seim I., Fang X., Xiong Z. et al. Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis brandtii* // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2212.

Senger P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc., Pullman, WA, 2003. 373 p.

Sharma R.S., Saxena R., Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective // Indian. J. Med. Res. 2018. V. 148. S10–S14.

Silva E., Greene A.F., Strauss K. et al. Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice // Reprod. Fertil. Dev. 2015. V. 27. № 6. P. 975–983.

Sloter E., Nath J., Eskenazi B., Wyrobek A.J. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents // Fertil. Steril. 2004. V. 81. № 4. P. 925–943.

Smith T.E., Faulkes C.G., Abbott D.H. Combined olfactory contact with the parent colony and direct contact with nonbreeding animals does not maintain suppression of ovulation in female naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) // Horm. Behav. 1997. V. 31. № 3. P. 277–288.

Steiner A.Z., Jukic A.M.Z. Impact of female age and nulligravidity on fecundity in an older reproductive age cohort // Fertil. Steril. 2016. V. 105. № 6. P. 1584–1588. e1.

Stowers L., Kuo T.H. Mammalian pheromones: emerging properties and mechanisms of detection // Curr. Opin. Neurobiol. 2015. V. 34. P. 103–109.

Tacutu R., Craig T., Budovsky A. et al. Human ageing genomic resources: integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing // Nucleic. Acids. Res. 2013. V. 41. D1027–1033.

Tesi M., Sabatini C., Vannozzi I. et al. Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study // Theriogenology. 2018. V. 118. P. 34–39.

Thacker P.D. Biological clock ticks for men, too // JAMA. 2004. V. 291. № 14. P. 1683–1685.

Valenzano D.R., Aboobaker A., Seluanov A., Gorbunova V. Non-canonical aging model systems and why we need them // EMBO J. 2017. V. 36. № 8. P. 959–963.

Van der Molen H.J., van Beurden W.M.O., Blankenstein M.A., et al. The testis: biochemical actions of trophic hormones and steroids on steroid production and spermatogenesis // J. Steroid. Biochem. 1979. V. 11. P. 13–18.

Vandenbergh J.G. The influence of social environment on sexual maturation in male mice // J. Reprod. Fertil. 1971. V. 24. P. 383–390.

Veron G.L. Tissera A.D., Bello R. et al. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics // Fertil. Steril. 2018. V. 110. № 1. P. 68–75. e4.

Vidal J.D. The impact of age on the female reproductive system // Toxicol. Pathol. 2017. V. 45. № 1. P. 206–215.

Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F., Paiss T., Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center // J. Assist. Reprod. Gen. 2009. V. 26. № 1. P. 41–46.

Winkler N. Babies after 40: Is the "Biological Clock" Really Ticking? Women's Reproductive Mental Health Across the Lifespan. Cham. Springer, 2014. P. 195–213.

Wright P.L. Variations in reproductive cycles in North American mustelids // Delayed Implantation / Ed. Enders A.C. Chicago, University of Chicago Press, 1963. P. 77–97.

Yamada K., Shimizu A., Ohta A. Effects of dimethylpyrazine isomers on reproductive and accessory reproductive organs in male rats // Biol. Pharm. Bull. 1993. V. 16. P. 203–206.

Yin Y., Stahl B.C., DeWolf W.C., Morgentaler A. p53-Mediated germ cell quality control in spermatogenesis // Dev. Biol. 1998. V. 204. № 1. P. 165–171.

Zhang H., Lu Y., Luo B., Yan S., Guo X., Dai J. Proteomic analysis of mouse testis reveals perfluorooctanoic acid-induced reproductive dysfunction via direct disturbance of testicular steroidogenic machinery // J. Proteome. Res. 2014. V. 13. P. 3370–3385.

Zhao B., Tumaneng K., Guan K.L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal // Nat. Cell. Biol. 2011. V. 13. № 8. P. 877–883.

Zhu L., Zhang Y., Liu Y. et al. Maternal and live-birth outcomes of pregnancies following assisted reproductive technology: a retrospective cohort study // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 35141.

Zini A., Bach P.V., Al-Malki A.H., Schlegel P.N. Use of testicular sperm for ICSI in oligozoospermic couples: how far should we go? // Hum. Reprod. 2017. V. 32. № 1. P. 7–13.

Development and Ageing of the Mammalian Reproductive System

S. Ya. Amstislavsky[1, 2, *], E. Yu. Brusentsev[1], O. M. Petrova[1, 2], V. A. Naprimerov[1, 3], and A. L. Levinson[2, 4]

[1]*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. Lavrenteva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*
[2]*Novosibirsk National Research State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*
[3]*Novosibirsk State Agrarian University, ul. Dobrolubova 160, Novosibirsk, 630037 Russia*
[4]*Novosibirsk Center of Reproductive Medicine, ul. Heroes of the Revolution 3, Novosibirsk, 630037 Russia*
**e-mail: amstis@yandex.ru*

Received May 6, 2019; revised September 11, 2019; accepted September 20, 2019

An overview of data on the development of the mammalian reproductive system is presented. Hormonal and social factors affecting the reproductive system development in mammals are in focus. Species that are characterized by early sexual maturation are discussed. Aging of the reproductive system in males and females are discussed as well. A special emphasis is made on the A special emphasis is made on the development and age-related changes of the reproductive system in humans. Some effects of the assisted reproductive technologies are mentioned and described in relation to the aging process.

Keywords: reproductive system, sexual maturation, mammals, ageing, reproductive technologies

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 64–72

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

УДК 577.175.829

ДОФАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ НЕЙРОНЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ У КРЫС: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СЕКРЕЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ

© 2020 г. А. И. Куртова[a], Л. К. Дильмухаметова[a], Т. С. Пронина[a], Э. Р. Мингазов[a], Ю. О. Никишина[a], К. К. Сухинич[a], М. В. Угрюмов[a, b, *]

[a] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

[b] *Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики", ул. Мясницкая, 20, Москва, 101000 Россия*

**e-mail: mugrumov@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.07.2018 г.
После доработки 22.05.2019 г.
Принята к публикации 20.06.2019 г.

Дофамин (ДА), синтезируемый ДА-ергическими нейронами и так называемыми моноферментными нейронами, участвует в регуляции дифференцировки нейронов мозга в критический период морфогенеза. Целью данной работы явилось изучение фенотипических особенностей ДА-продуцирующих нейронов в ряде отделов мозга (стриатум, супрахиазматическое ядро и аркуатное ядра) у крыс в онтогенезе – с 18-го эмбрионального дня (Э18) до 60-го постнатального дня (П60). В качестве маркеров функциональной активности этих нейронов использованы ферменты синтеза ДА – тирозингидроксилаза (ТГ) и декарбоксилаза ароматических аминокислот (ДАА), везикулярные транспортеры моноаминов (ВМАТ) и рецепторы к дофамину Д1 и Д2. Экспрессия данных маркеров была исследована с помощью двойного иммуногистохимического мечения на ТГ и ДАА, а также с помощью ПЦР генов ТГ, ДАА, ВМАТ1, ВМАТ2 и рецепторов к ДА – Д1 и Д2. В стриатуме, несмотря на то, что мРНК всех перечисленных маркеров выявляется на протяжении всего исследуемого периода онтогенеза, иммунопозитивные на ТГ и ДАА биферментные нейроны обнаружены только на Э18, а моноферментные ТГ или ДАА-содержащие нейроны – только на П60. В супрахиазматическом ядре в раннем постнатальном периоде (П10), наряду с моноферментными ДАА-нейронами, присутствует моноферментные ТГ-иммунореактивные волокна, иннервирующие вентральную область ядра. В супрахиазматическом ядре на П10 отсутствует экспрессия генов ТГ, ВМАТ1 и ВМАТ2, однако обнаружены транскрипты генов Д1 и Д2. В аркуатном ядре у плодов крыс в конце пренатального периода (Э21) содержатся только моноферментные нейроны: ТГ-нейроны – в вентролатеральной области ядра, и ДАА-нейроны – в дорсомедиальной области. При этом было показано, что мРНК ТГ, ДАА, ВМАТ2, Д1 и Д2 экспрессируется в обеих областях аркуатного ядра. Таким образом, в стриатуме, супрахиазматическом и аркутном ядрах у крыс в онтогенезе присутствуют недофаминергические нейроны, содержащие по одному из ферментов – ТГ или ДАА, что позволяет предположить наличие в этих отделах мозга кооперативного синтеза дофамина.

Ключевые слова: мозг, онтогенез, дофамин, моноферментные нейроны, тирозингидроксилаза, декарбоксилаза ароматических аминокислот, аркуатное ядро, стриатум, супрахиазматическое ядро

DOI: 10.31857/S0475145020010036

ВВЕДЕНИЕ

Биогенные моноамины, в частности дофамин (ДА), в развивающемся мозге играют роль морфогенетических факторов, обеспечивающих аутокринную и паракринную регуляцию дифференцировки нейронов-мишеней (Gaspar et al., 2003; Pronina et al., 2003; Izvolskaya et al., 2005). В наших предыдущих исследованиях показано, что ДА синтезируется не только в дофаминергических нейронах, экспрессирующих оба фермента синтеза ДА – тирозингидроксилазу (ТГ) и декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (ДАА), но и в недофаминергических, так называемых моноферментных нейронах, содержащих по одному из указанных ферментов (Ugrumov et al., 2004, 2013; Kozina et al., 2017). В отличие от ДА-ергических нейронов, в которых реализуются все этапы синтеза ДА из L-тирозина – аминокислоты-предшественницы, моноферментные нейроны производят этот нейротрансмиттер в тандеме по конвейерному принципу. При этом в нейронах, экспрессирующих только ТГ, L-тирозин превращается в L-диоксифенилала-

нин (L-ДОФА), который выделяется из этих нейронов и захватывается близлежащими нейронами, содержащими ДАА, где и происходит синтез ДА (Ugrumov, 2013). Несмотря на то, что кооперативный синтез ДА моноферментными нейронами доказан, особенности фенотипа, отражающие молекулярные механизмы функционирования этих нейронов мало изучены. Так, остается невыясненным экспрессируют ли моноферментные нейроны гены "везикулярных моноаминовых транспортеров 1 и 2" (ВМАТ1 и ВМАТ2), обеспечивающих захват ДА из цитозоля в везикулы (Hoffman et al., 1998).

Особый интерес представляет судьба моноферментных нейронов в онтогенезе. Так, предполагается, что ТГ-иммунореактивные нейроны, иннервирующие супрахиазматическое ядро (СХЯ) в раннем постнатальном периоде, позднее либо перестают экспрессировать ТГ, либо погибают (Beltramo et al., 1994; Ugrumov, 2009). В отличие от СХЯ, в аркуатном ядре (АЯ) моноферментные нейроны сохраняются в течение всей жизни, причем в постнатальном периоде в части этих нейронов ко-экспрессируется по второму комплементарному ферменту синтеза ДА. Эти биферментые нейроны можно считать дофаминергическими, хотя в них низкий уровень экспрессии мембранного переносчика ДА, третьего обязательного атрибута дофаминергических нейрнов (Ershov et al., 2002).

Целью данной работы явилось изучение фенотипических особенностей ДА-продуцирующих нейронов, характеризующих молекулярные механизмы секреции и регуляции, в мозге у крыс в онтогенезе. В качестве объектов исследования были выбраны АЯ, СХЯ и стриатум – те отделы мозга, в которых, по нашим предыдущим данным и данным литературы, на определенных этапах онтогенеза доминируют моноферментные нейроны (Beltramo et al., 1994; Ershov et al., 2002, Buscetti et al., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar на 18-й день эмбрионального периода (Э18), Э21, 5-й день постнатального периода (П5), П10 и П60. День обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке считали первым эмбриональным днем, а день рождения крысят – первым постнатальным днем. Все манипуляции с животными были проведены согласно протоколу, утвержденным комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, и находящемуся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Иммуногистохимия. Животных (беременных самок и самцов) предварительно анестезировали хлоралгидратом (Sigma, USA) в дозе 400 мг/кг, а затем перфузировали через сердце сначала 0.02 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (pH 7.2–7.4) в течение 10–15 мин при 37°С, а затем охлажденным (4°С) 4% параформальдегидом на 0.2 М ФСБ (pH 7.2–7.4) в течение 15 мин. После декапитации выделяли мозг и проводили постфиксацию в 4% параформальдегиде в течение 12 часов при 4°С. Затем мозг промывали в 0.02 М ФСБ 3 раза по 15 мин, инкубировали в 20% сахарозе в течение 24 ч при 4°С, замораживали в гексане при –40°С и хранили при –70°С. Мозг был получен от четырех животных каждого возраста – Э18, Э21, П5, П10 и П60.

На криостате LeicaCM1950 ("Leica", Германия) приготавливали серийные фронтальные срезы мозга крыс толщиной 10 мкм на уровне стриатума на Э18, Э21, П5, П10 и П60, АЯ на Э21 и СХЯ на П10. Для двойного иммуномечения ТГ и ДАА срезы на стеклах последовательно инкубировали в растворах на основе ФСБ: а) с 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США) и 0.3% Triton X-100 (Sigma, США) в течение 30 мин при 20°С; б) с 1% лаурилсульфатом натрия (SDS, Sigma, США) в течение 3-х мин при 20°С; в) с поликлональными антителами овцы к ТГ (1 : 700) (Chemicon, США) и поликлональными антителами кролика к ДАА (1 : 300) (Abcam, США), 1% бычьим сывороточным альбумином и 0.1% Triton X-100 в течение 24 ч при 20°С; г) с FITC-конъюгированными антителами осла против гамма-глобулинов овцы (1 : 40) (FITC antisheep, Sigma, США) и Cy3-конъюгированными антителами козы против гамма-глобулинов кролика (1 : 500) (CY3 antirabbit, Sigma, США) в течение 2-х ч при 20°С. После каждой инкубации, кроме последней, срезы промывали в 0.02 М ФСБ 3 раза в течение 15 мин. После последней инкубации срезы промывали в 0.02 М ФСБ в течение часа и заключали в гидрофильную среду Mowiol (Calbiochem, Germany). Срезы стриатума, АЯ и СХЯ изучали в конфокальном микроскопе Leica TC SP5.

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР). Крыс под наркозом декапитировали и извлекали мозг. Затем приготавливали фронтальные срезы стриатума, АЯ и СХЯ толщиной 300 мкм на вибратоме Vibratome Series 1000 ("Intracel LTD", Великобритания) в растворе Кребса–Рингера, содержащем 120 мМ NaCl, 4.8 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1.3 мМ $MgSO_4$, 25 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ D-глюкозы, 20 мМ HEPES, 0.1 мМ аскорбиновой кислоты (pH 7.2–7.4; 4°С). Из полученных срезов на охлажденной пластине под контролем бинокуляра выделяли стриатум (на Э18, Э21, П5, П10, П60), АЯ (на Э21) и СХЯ (на П10). При этом АЯ разделяли на дорсомедиальную и вентролатеральную области, которые собирали в отдельные пробирки. В одной пробе пулировали АЯ от четырех животных, а СХЯ от шести животных. В случае стри-

Таблица 1. Специфические гексоолигонуклеотиды

Ген	5'-3' смысловой	5'-3' антисмысловой
TH	CTGTCCGCCCGTGATTTT	GAGGCCCCCAGAGATG
AADC	CCCCAGGAGCCAGAAACA	AGCCCAGGAGAAGCCAATG
VMAT1	CATCTACTGGGGGTGTTATCGT	TGTGGGCTTCTGGACTGTGT
VMAT2	TATAACCGCGCAGTCACAGG	AGCAGCAGCGCAAGGAAC
D1R	CAACTGGGGCTGAACAAGAAG	GGAAACAGGCCGTGAGGAT
D2R	CAGACAGGCCCCACTACAACTA	ACAACCCACGGCATTACCA
18S rRNA[2]	ACGGACCAGAGCGAAAGCAT	TGTCAATCCTGTCCGTGTCC
GAPDH	CTGACATGCCGCCTGGAGAAA	TGGAAGAATGGGAGTTGCTGTTGA

атума одна проба включала материал от одного животного. Всего было собрано по 4 пробы из каждой области мозга. Полученные образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при –70°С.

Из описанных выше проб выделяли тотальную РНК с помощью TRI Reagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Для удаления примеси геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, США). РНК переосаждали в 4 М растворе хлорида лития, концентрацию обработанной РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MLV и рандомных гексануклеотидов (Fermentas, США).

В СХЯ и АЯ с помощью ПЦР определяли экспрессию генов ТГ, ДАА, ВМАТ1, ВМАТ2, а также генов рецепторов к ДА – Д1 и Д2. В стриатуме с помощью ПЦР определяли мРНК ВМАТ1 и ВМАТ2. ПЦР проводили на амплификаторе IQ5 Cycler (Biorad, США) с использованием смеси ScreenMix-HS (“Евроген”, Россия) и специфических праймеров для генов ТГ, ДАА, ВМАТ1, ВМАТ2, Д1, Д2 и “гена домашнего хозяйства” GAPDH (“Евроген”, Россия) (табл. 1). Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1% агарозном геле, интенсивность свечения полос детектировали в системе визуализации гелей и мембран Chemi Doctm Touch Imaging System (BioRad Laborarories, США).

В стриатуме на Э18, Э21, П5, П10 и П60 также определяли содержание мРНК ТГ и ДАА с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили с помощью автоматического амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR + ROX (Fermentas, США) и специфических праймеров для генов ТГ и ДАА (“Евроген”) (табл. 1). Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию “гена домашнего хозяйства” 18S рРНК и выражали в условных единицах. Расчет относительной экспрессии гена проводили методом ΔΔCt с учетом эффективности ПЦР. За единицу брали экспрессию гена на П60, как наиболее стабильную. Эффективность ПЦР определяли методом построения стандартных кривых (Bookout et al., 2006). Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стриатум. При использовании двойного иммуномечения нейроны, иммунореактивные на ТГ и ДАА (биферментные), были обнаружены в стриатуме у крыс только на Э18 (рис. 1а–1в). На Э21, П5 и П10 нейроны, иммунореактивные на ТГ и/или ДАА, не были обнаружены. На П60 в стриатуме были выявлены моноферментные нейроны, иммунореактивные на ДАА или ТГ (рис. 1).

С помощью ПЦР в стриатуме у крыс всех изученных возрастов (Э18, Э21, П5, П10, П60) выявлена мРНК ТГ и ДАА. При использовании ПЦР в реальном времени показано, что уровень мРНК ТГ максимален на Э18, затем многократно снижается к Э21 и после этого не изменяется до П60 (рис. 2а). Уровень мРНК ДАА не изменяется в течение всего изученного периода онтогенеза – с Э18 до П60 (рис. 2б).

С помощью ПЦР в стриатуме у крыс были выявлена мРНК ВМАТ1 на всех исследованных сроках развития – Э18, Э21, П5, П10, П60, тогда как мРНК ВМАТ2 была обнаружена только в пренатальном периоде – на Э18 и Э21 (рис. 3).

Супрахиазматическое ядро. С помощью двойного иммуномечения ТГ и ДАА у крыс на П10 в вентральной области СХЯ выявлены многочисленные моноферментные ТГ-иммунореактивные нервные волокна, образующие сплетение (рис. 4а). В дорсальной части ядра присутствуют моноферментные ДАА-иммунореактивные нейроны (рис. 4а).

Анализ экспрессии генов с помощью ПЦР показал, что в СХЯ на П10 присутствует мРНК ДАА, Д1 и Д2 рецепторов. При этом не была обнаружена мРНК ТГ и ВМАТ2 (рис. 4б).

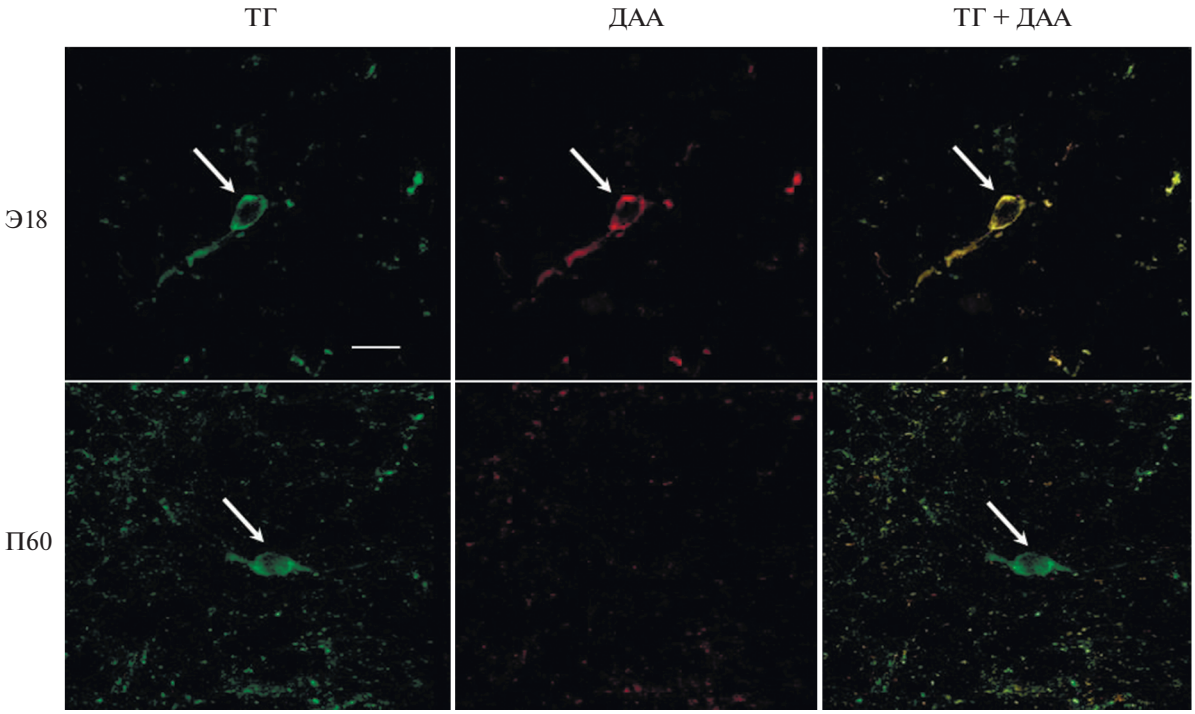

Рис. 1. Двойное иммуномечение нейронов, экспрессирующих ферменты синтеза дофамина в стриатуме у крыс в онтогенезе. Масштаб – 30 мкм, ТГ – тирозингидроксилаза, ДАА – декарбоксилаза ароматических аминокислот, Э18 – 18-ый эмбриональный день, П60 – 60-ый постнатальный день; стрелки – иммунореактивные нейроны.

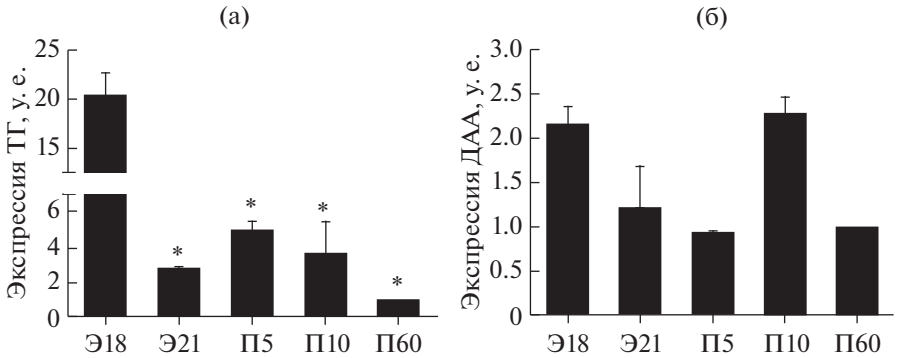

Рис. 2. ПЦР в реальном времени мРНК тирозингидроксилазы (ТГ) (а) и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА) (б) в стриатуме у крыс на 18-й эмбриональный день (Э18), Э21, 5-й постнатальный день (П5), П10 и П60. $M \pm m$, $n = 4$ (в каждой возрастной группе), * $p < 0.05$, сравнение с Э18.

Аркуатное ядро. Двойное иммуномечение ТГ и ДАА показало, что в АЯ на Э21 практически все нейроны, иммунореактивные на ТГ и ДАА, являются моноферментными (рис. 5а). Действительно, при анализе серийных срезов АЯ пяти плодов крыс был обнаружен только один биферментный нейрон (рис. 5а). Моноферментные ТГ-иммунореактивные нейроны локализованы в вентролатеральной области ядра, а моноферментные ДАА-иммунореактивные нейроны – в дорсомедиальной области ядра (рис. 5а).

Анализ экспрессии генов ферментов синтеза ДА на Э21 показал, что мРНК ТГ и ДАА присутствует как в вентролатеральной, так и в дорсомедиальной областях АЯ (рис. 5б). Также в обеих областях АЯ на Э21 обнаружена мРНК ВМАТ2, Д1 и Д2 рецепторов (рис. 5б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании показано, что нейроны, содержащие ферменты синтеза ДА, в исследованных отделах мозга – в стриатуме, в СХЯ и в

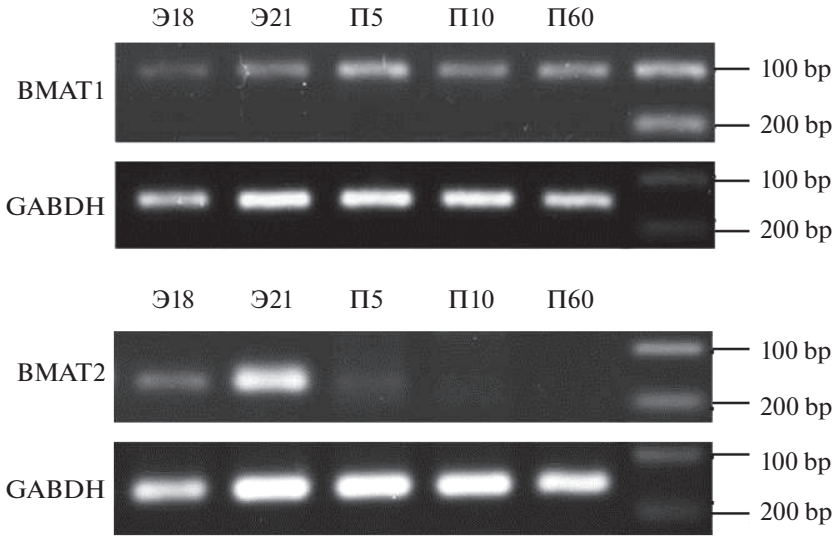

Рис. 3. Экспрессия генов BMAT1 и BMAT2 в стриатуме у крыс на 18-й эмбриональный день (Э18), Э21, 5-й постнатальный день (П5), П10 и П60. Данные нормированы на "ген домашнего хозяйства" (GAPDH). BMAT1 и BMAT2 – везикулярный транспортер моноаминов первого и второго типов.

АЯ, различаются как по протеомному фенотипу, так и по экспрессии специфических генов. Так, в стриатуме у крыс на разных стадиях онтогенеза выявлены два типа нейронов, характеризующиеся различными признаками ДА-ергического фенотипа. Нейроны первого типа, выявленные на Э18, содержат оба фермента синтеза ДА. В этих же нейронах вероятно экспрессируется ген белка BMAT2, обеспечивающего запасание моноаминов в центральных моноаминергических нейронах, включая ДА-ергические нейроны черной субстанции. Захват моноаминов в гранулы из места их синтеза в цитозоле защищает их от ферментов деградации и предотвращает токсическое действие моноаминов при их избыточном накоплении в цитозоле (Schafer et al., 2013). В совокупности приведенные данные позволяют предположить, что в стриатуме у крыс на Э18 содержатся ДА-ергические нейроны, хотя для утверждения этого в дальнейших исследованиях следует убедиться в экспрессии в них гена мембранного транспортера ДА.

Нейроны второго типа, содержащиеся в стриатуме, причем только у взрослых крыс (П60), но отсутствующие в перинатальном периоде (Э21–П10), являются моноферментными, содержащими либо ТГ, либо ДАА. Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными в работе Mura с коллегами (Mura et al., 1995), в которой показаны моноферментные нейроны, содержащие либо ТГ, либо ДАА в стриатуме у взрослых крыс после 6-гидроксидофамин-индуцированной односторонней дофаминергической денервации стриатума. Более того, по данным Ibáñez-Sandoval с коллегами и Xenias с коллегами в стриатуме у взрослых мышей коэкспрессия ТГ выявляется в ГАМК-ергических нейронах (Ibáñez-Sandoval et al., 2010; Xenias et al., 2015).

В отличие от типичных центральных моноаминергических нейронов, нейроны стриатума во все изученные сроки постнатального периода от П5 до П60, вместо гена BMAT2 экспрессируют ген BMAT1. Считается, что для ЦНС характерна экспрессия гена BMAT2, а BMAT1 экспрессируется в основном на периферии. Тем не менее, Hansson с коллегами (Hansson et al., 1998) показывает, что мРНК BMAT1 обнаруживается в мозге у крыс в различные периоды онтогенеза, что подтверждает полученные нами результаты. Однако работы, в которых, помимо экспрессии гена BMAT1, был бы обнаружен соответствующий белок, отсутствуют, поэтому данный вопрос требует дальнейшего изучения. Учитывая то, что, в отличие от стриатума, куда проецируются ДА-ергические аксоны, в черной субстанции, содержащей тела этих нейронов, экспрессируется ген BMAT2, можно предположить наличие различных механизмов запасания моноаминов в указанных отделах нигростриатной системы мозга.

Несмотря на то, что в перинатальном периоде (Э21–П10) в стриатуме у крыс иммуногистохимически не были обнаружены нейроны, содержащие ферменты синтеза ДА, в нейронах стриатума экспрессируются гены ТГ и ДАА. Это означает, что в перинатальном периоде либо не происходит трансляции ферментов синтеза дофамина, либо трансляция идет, но на таком низком уровне, что не выявляется иммуногистохимически. В литературе в раннем постнатальном периоде моноферментные ТГ-нейроны описаны в стриатуме толь-

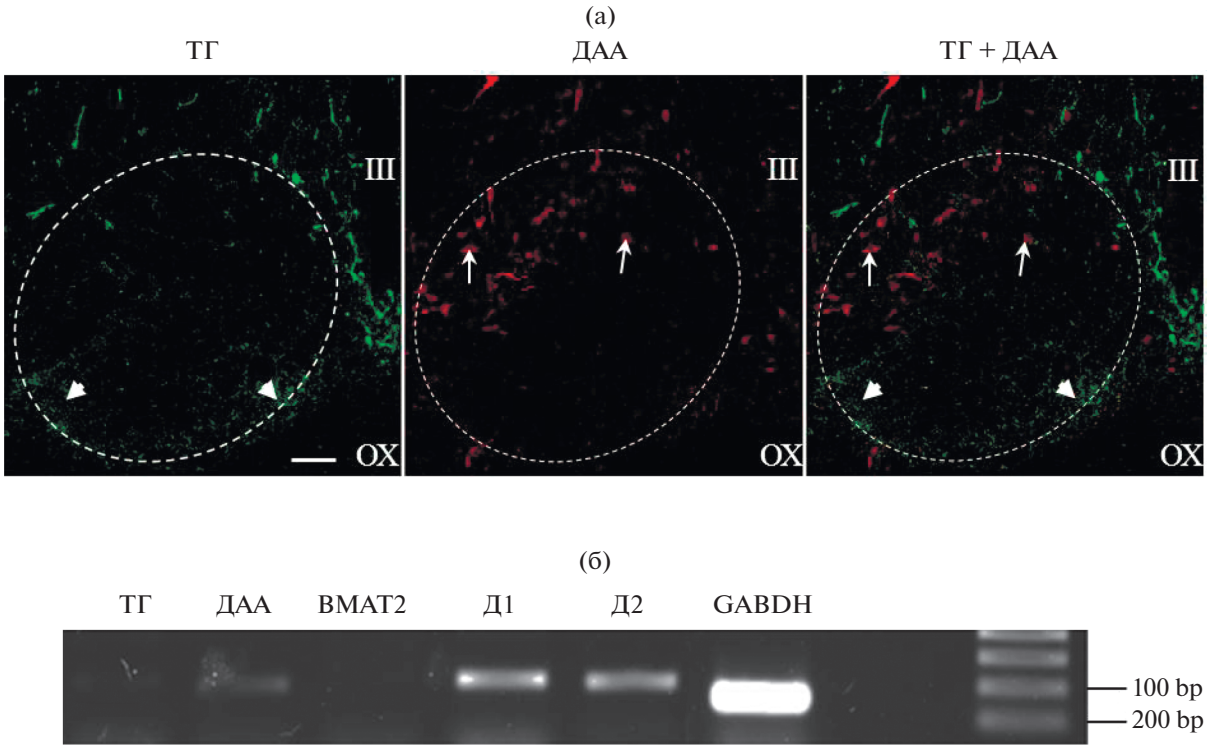

Рис. 4. Нейроны, экспрессирующие маркеры дофаминергического фенотипа в супрахиазматическом ядре (пунктирная линия) у крыс на 10-й постнатальный день: сплетение моноферментных ТГ-иммунореактивных нервных волокон (головки стрелок), моноферментные ДАА-иммунореактивные нейроны (тонкие стрелки) (двойное иммуномечение), мРНК ТГ, ДАА, BMAT2, Д1 и Д2 рецепторов (ПЦР, нормирование по “гену домашнего хозяйства” – GAPDH) (б). Масштаб рис. а – 40 мкм. OX – оптическая хиазма, III – 3-й желудочек мозга, ТГ – тирозингидроксилаза, ДАА – декарбоксилаза ароматических аминокислот, BMAT2 – везикулярный транспортер моноаминов второго типа, Д1 и Д2 – рецепторы к дофамину 1 и 2-ого типов.

ко у мышей (Buscetti et al., 2012; Bupesh et al., 2014). По-видимому, у мышей и крыс существуют различия в экспрессии ТГ в стриатуме. Уровень мРНК ДАА в стриатуме сохранялся постоянным на всех исследованных сроках, хотя нейроны, содержащие ДАА, выявлялись только на Э18. По представлениям Mura и коллег, ДАА-нейроны в интактном стриатуме могут маскироваться плотной сетью ДАА-волокон, что не позволяет визуализировать нейроны (Mura et al., 1995). С другой стороны, очень часто отсутствует корреляция между транскрипцией и трансляцией (Kozina et al., 2014), что объясняется различными механизмами регуляции этих процессов.

В отличие от стриатума, в СХЯ отсутствует экспрессия гена ТГ, однако вентральная область этого ядра, причем только в раннем постнатальном периоде, заполнена сетью моноферментных ТГ-иммунореактивных нервных волокон (см. Результаты). Наличие такой транзиторной сети ТГ-иммунореактивных волокон в СХЯ было показано в нашем предыдущем исследовании (Beltramo et al., 1994) и подтверждено в данной работе. Более того, нами было ранее показано, эти волокна принадлежат моноферментным нейронам, расположенным за пределами СХЯ, хотя и недалеко от него (Mirochnik et al., 2002).

Обнаружение у взрослых грызунов в СХЯ вазопрессинергических нейронов, ко-экспрессирущих ДАА (Jaeger et al., 1983), позволило нам предположить, что ТГ-содержащие волокна и вазопрессинергические нейроны, ко-экспрессирующие ДАА, могут участвовать в кооперативном синтезе ДА. Выявленная в данном исследовании экспрессия гена ДАА в СХЯ у крыс на П10 является важным аргументом в пользу этого предположения. Дополнительный анализ показал, что в этих нейронах СХЯ в этот период развития отсутствует экспрессия мРНК BMAT2, что указывает на неспособность моноферментных вазопрессинергических нейронов депонировать синтезированный из L-ДОФА ДА в секреторных гранулах, как это происходит в моноаминергических нейронах.

Крайне интересно и важно то, что в СХЯ совпадают по времени (ранний постнатальный период) два транзиторных события. С одной стороны, это – высокое содержание ТГ в нервных волокнах, что при наличии в СХЯ ДАА в вазопрессинергических нейронах предполагает наличие кооператив-

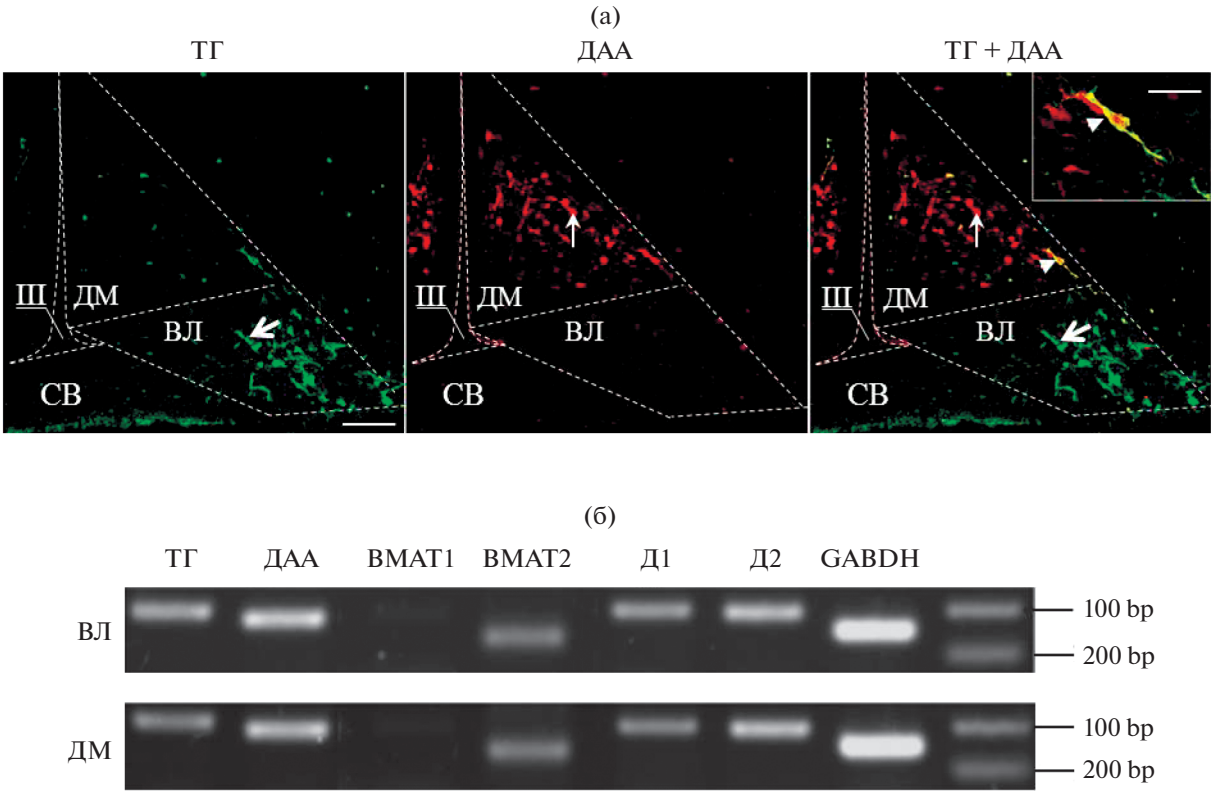

Рис. 5. Нейроны, экспрессирующие маркеры дофаминергического фенотипа в аркуатном ядре (пунктирная линия) у крыс на 21-й эмбриональный день: моноферментные ТГ-иммунореактивные нейроны в вентролатеральной области (ВЛ) ядра (широкая стрелка) и моноферментные нейроны, иммунореактивные на ДАА в дорсомедиальной области (ДМ) ядра (тонкая стрелка) (а, двойное иммуномечение), мРНК ТГ, ДАА, BMAT1, BMAT2, Д1 и Д2 рецепторов (б, ПЦР, нормирование по “гену домашнего хозяйства” – GAPDH). Масштаб рис. а – 40 мкм. III – 3-й желудочек мозга, СВ – срединное возвышение, головка стрелки – биферментный нейрон, ТГ – тирозингидроксилаза, ДАА – декарбоксилаза ароматических аминокислот, BMAT1 и BMAT2 – везикулярный транспортер моноаминов первого и второго типов, Д1 и Д2 – рецепторы к дофамину 1 и 2-ого типов.

ного синтеза ДА. С другой стороны, это – экспрессия рецепторов к ДА – Д1 и Д2, при отсутствии дофаминергических нейронов в СХЯ и его ближайшем окружении. В этом отношении наши данные хорошо согласуются с предыдущими исследованиями, в которых показано, что рецепторы к ДА экспрессируются в СХЯ у крыс в перинатальном периоде и отсутствуют у взрослых животных (Duffield et al., 1999). Учитывая то, что ранний постнатальный период является критическим периодом морфогенеза, нами предполагается, что транзиторный кооперативный синтез ДА недофаминергическими нейронами и экспрессия рецепторов к ДА в СХЯ именно в этот период онтогенеза обеспечивают дофаминовую регуляцию развития этого ядра как “биологических часов” (Ugrumov, 2009). Предположение о том, что ДА через Д1 рецепторы обеспечивает созревание механизма регуляции циркадных ритмов также было высказано Gallardo с коллегами (Gallardo et al., 2014). Однако, эти исследователи считают, что ДА диффундирует в СХЯ из стриатума по градиенту концентрации, что маловероятно ввиду большого расстояния между ними.

Особое внимание в данной работе было уделено оценке экспрессии маркеров ДА-ергических нейронов в АЯ гипоталамуса – важнейшем центре нейроэндокринной регуляции. По данным ранее проведенного исследования в АЯ в конце пренатального периода более 99% нейронов, экспрессирующих ферменты синтеза ДА, представлены моноферментными нейронами, причем ТГ-нейроны в основном локализованы в вентролатеральной области ядра, а ДАА-нейроны – в дорсомедиальной области (Ershov et al., 2002). Эти данные полностью подтвердились в нашем иммуногистохимическом исследовании: на серийных срезах АЯ четырех плодов крыс на Э21 на фоне многочисленных моноферментных ТГ-иммунореактивных и ДАА-иммунореактивных нейронов был выявлен только один биферментный нейрон в пограничной зоне между вентролатеральной и дорсомедиальной областями АЯ.

В данной работе впервые с помощью ПЦР продемонстрирована экспрессия генов ТГ и ДАА в АЯ, причем как в дорсомедиальной области, так и вентролатеральной области, что противоречит иммуноцитохимическим данным о зональности в распределении моноферментных нейронов. Топографическое несоответствие в экспрессии генов и локализации моноферментных нейронов, содержащих ТГ или ДАА, можно объяснить наличием нейронов, в которых экспрессируются гены обоих ферментов синтеза ДА, но только один из ферментов синтезируется на уровне, достаточно высоком для иммуноцитохимического выявления. Аналогичная ситуация была описана выше для стриатума неонатальных крыс, когда экспрессируются гены ТГ и ДАА, однако сами ферменты в телах нейронов иммуногистохимически не выявляются. Нельзя также исключить, что ген ДАА в вентролатеральной области АЯ экспрессируется не столько в нейронах, сколько в эндотелиальных клетках портальных сосудов, что характерно вообще для сосудов мозга (Berry et al., 1996).

Особый интерес представляет обнаруженная нами экспрессия гена BMAT2 как в вентролатеральной, так и в дорсомедиальной областях АЯ у плодов крыс на Э21. Если экспрессию гена BMAT2 в моноферментных ДАА-нейронах дорсомедиальной области АЯ можно легко объяснить участием этого транспортера в захвате ДА из цитозоля в секреторные гранулы, то экспрессию гена BMAT2 в вентролатеральной области АЯ объяснить гораздо труднее. Действительно, в вентролатеральной области АЯ локализованы преимущественно моноферментные ТГ-нейроны, в которых осуществляется синтез L-ДОФА из L-тирозина. До сих пор отсутствуют какие-либо сведения о механизме внутринейронального запасания L-ДОФА, если оно вообще существует. Не исключено, что в отличие от ДА-ергических нейронов, в которых L-ДОФА содержится только в цитозоле, в моноферментных нейронах он депонируется в секреторных гранулах, что следует проверить в будущем с помощью электронномикроскопической иммуноцитохимии. Приведенные выше данные в совокупности позволяют предположить, что в моноферментных нейронах разных областей АЯ экспрессируется одинаковый набор генов, а особенности их химического фенотипа определяются на трансляционном уровне специфических синтезов.

Таким образом, в исследованных отделах мозга у крыс в онтогенезе обнаружено несколько типов нейронов, обладающих теми или иными характеристиками фенотипа ДА-ергических нейронов, что, вероятно, позволяет им синтезировать ДА, оказывающий аутокринное или паракринное морфогенетическое действие на нейроны-мишени.

Работа поддержана грантом РНФ 17-14-01422.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Beltramo M., Calas M., Chernigovskaya E. et al. Postnatal development of the suprachiasmatic nucleus in the rat. Morpho-functional characteristics and time course of tyrosine hydroxylase immunopositive fibers // Neuroscience. 1994. V. 63. № 2. P. 603–610.

Berry M.D., Juorio A.V., Li X.-M. et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase: A neglected and misunderstood enzyme // Neurochem. Res. 1996. V. 21. № 9. P. 1075–1087.

Bookout A., Cummins C., Mangelsdorf D. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2006. P. 15.8.1–15.8.28.

Bupesh M., Vicario A., Abellan A. et al. Dynamic expression of tyrosine hydroxylase mRNA and proteinin neurons of the striatum and amygdala of mice, and experimental evidence of their multiple embryonic origin // Brain Struct. Funct. 2014. V. 219. № 3. P. 751–776.

Buscetti C.L., Bucci D., Molinaro G. et al. Lack or inhibition of dopaminergic stimulation induces a development increase of striatal tyrosine hydroxylase-positive interneurons // PLoS One. 2012. V. 7. № 9. e44025.

Duffield G.E., McNulty S., Ebling F.J.P. Anatomical and functional characterisation of a dopaminergic system in the suprachiasmatic nucleus of the neonatal siberian hamster // J. Comp. Neurol. 1999. V. 408. P. 73–96.

Ershov P., Ugrumov M.V., Calas A. et al. Neurons possessing enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of rats: topographic relations and axonal projections to the median eminence in ontogenesis // J. Chem. Neuroanat. 2002. V. 24. № 2. P. 95–107.

Gallardo C.M., Darvas M., Oviatt M. et al. Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice // Elife. 2014. V. 3. e03781.

Gaspar P. Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 1002–1102.

Hansson S.R., Hoffman B.J., Mezey E. Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2: I. The developing rat central nervous system // Brain Res. Dev. Brain. Res. 1998. V. 110. № 1. P. 135–158.

Hoffman B.J., Hansson S.R., Mezey E., Palkovits M. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system // Front. Neuroendocrinol. 1998. V. 19. P. 187–231.

Ibáñez-Sandoval O., Tecuapetla F., Unal B. et al. Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. J. Neurosci. 2010. V. 30. P. 6999–7016.

Izvolskaya M.S., Adamskaya E.I., Voronova S.N. et al. Catecholamines in regulation of development of GnRH neurons of rat fetuses // Russian J. Developmental Biology. 2005. V. 36. № 6. P. 369–376.

Jaeger C.B., Albert V.R., Joh T.H. et al. Aromatic l-amino acid decarboxylase in the rat brain: coexistence with vasopressin in small neurons of the suprachiasmatic nucleus // Brain Res. 1983. V. 276. № 2. P. 362–366.

Kozina E.A., Kim A.R., Kurina A.Y., Ugrumov M.V. Cooperative synthesis of dopamine by non-dopaminergic neurons as a compensatory mechanism in the striatum of

mice with MPTP-induced Parkinsonism // Neurobiology of Disease. 2017. V. 98. P. 108–121.

Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. et al. Tyrosine hydroxylase expression and activity in the nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism // J. Neurol. Sci. 2014. V. 340. P. 198–207.

Mirochnik V.V., Makarenko I.G., Ugryumov M.V. The Source of transitory innervation of suprachiasmatic nucleus by tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers during postnatal period in rats // Russian J. Developmental Biology. 2002. V. 33. № 3. P. 147–150.

Mura A., Jackson D., Manley M.S. et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the ratstriatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine // Brain Research. 1995. V. 704. P. 51–60.

Pronina T., Ugrumov M., Calas A. et al. Influence of monoamine on differentiating gonadotropin-releasing hormone neurones in foetal mice // J. Neuroendocrinol. 2003. V. 15. P. 925–932.

Schafer M.K.-H., Weihe E., Eiden L.E. Localization and expression of VMAT2 across mammalian species: A translational guide for its visualization and targeting in health and disease // Adv. Pharmacol. 2013. V. 68. P. 319–334.

Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: Paradoxical reality // Neurochem. Res. 2010. V. 35. P. 837–850.

Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation // Adv. Pharmacol. 2013. V. 68. P. 37–91.

Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance // J. Chem. Neuroanat. 2009. V. 38. P. 241–256.

Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V. et al. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats // Neuroscience. 2004. V. 124. № 3. P. 629–635.

Xenias H.S., Ibáñez-Sandoval O., Koós T., Tepper J.M. Are striatal tyrosine hydroxylase interneurons dopaminergic? // J. Neurosci. 2015. V. 35. P. 6584–6599.

Dopamine-Producing Neurons in Ontogeny in Rats: Phenotypic Features that Characterize the Molecular Mechanisms of Secretion and Regulation

A. I. Kurtova[1], L. K. Dil'mukhametova[1], T. S. Pronina[1], E. P. Mingazov[1], Y. O. Nikishina[1], K. K. Sukhinich[1], and M. V. Ugrumov[1, 2, *]

[1]*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

[2]*Higher School of Economics, National Research University, ul. Myasnitskaya 20, Moscow, 101000 Russia*

**e-mail: mugrumov@mail.ru*

Received July 30, 2018; revised May 22, 2019; accepted June 20, 2019

Dopamine (DA) is synthesized by dopaminergic and so-called monoenzymatic neurons and is involved in the regulation of neural differentiation during the critical period of morphogenesis. The goal of this study was to investigate the phenotype of DA-producing neurons in different brain regions (striatum, suprachiasmatic and arcuate nuclei) of developing rats – from 18 embryonic day (E18) until 60 postnatal day (P60). We have chosen enzymes of DA synthesis – tyrosine hydroxylase (TH) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), vesicular monoamine transporters (VMAT 1 and VMAT2) and D1 and D2 DA receptors as markers of the DA-producing neurons functional activity. Expression of these markers was assayed with the double staining immunohistochemistry for TH and AADC and with PCR of TH, AADC, VMAT1, VMAT2 and D1 and D2 DA receptor genes. In the striatum the mRNA of all of these genes was found at any time investigated, however TH and AADC immunopositive bienzymatic neurons were revealed only at E18, while monoenzymatic TH or AADC-containing neurons – only at P60. In the suprachiasmatic nucleus monoenzymatic AADC-neurons and monoenzymatic TH-immunoreactive fibers innervating ventral part of nucleus were found in the early postnatal period (P10). The expression of TH, VMAT1 and VMAT2 genes wasn't found in the suprachiasmatic nucleus at P10, but there was an expression of D1 and D2 receptor genes. In the arcuate nucleus there were only monoenzymatic neurons found in the end of prenatal period (E21) – TH-neurons in the ventrolateral region and AADC-neurons – in the dorsomedial part. Thus striatum as well as suprachiasmatic and arcuate nuclei of developing rats contain non-dopaminergic neurons, that express one of the enzymes of DA synthesis – either TH or AADC, and this allows to suggest that there is cooperative synthesis of DA in these brain regions.

Keywords brain, ontogenesis, dopamin, monoenzymatic neurons, tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, arcuate nuclei, striatum, suprachiasmatic nuclei

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 1, с. 73–78

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

УДК 57.017.642:591.471.374

ЗАВИСИМОСТЬ ОТНОШЕНИЯ ДЛИН ВТОРОГО И ЧЕТВЕРТОГО ПАЛЬЦЕВ (2D:4D) ОТ УСЛОВИЙ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ (*ARVICOLA AMPHIBIUS* L.)

© 2020 г. Г. Г. Назарова[a], *, Л. П. Проскурняк[a], Е. И. Южик[a, b], **

[a] *Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия*

[b] *Институт молекулярной патологии и патоморфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117 Россия*

**e-mail: galinanazarova@mail.ru*

***e-mail: infuturo@mail.ru*

Поступила в редакцию 12.03.2019 г.
После доработки 25.09.2019 г.
Принята к публикации 30.09.2019 г.

Отношение длин второго и четвертого пальцев (2D:4D) используется как маркер пренатальной андрогенизации. Подобное отношение длин пальцев 2D:4D обнаружено у человека и многих видов животных. Морфологические маркеры пренатальных воздействий важны в популяционных исследованиях. Нами проведено измерение пальцевого индекса 2D:4D у самцов и самок водяной полевки (*Arvicola amphibius* L.). Проведен анализ зависимости этого показателя от пола и морфофизиологических характеристик матери (масса тела после родов, уровень тестостерона в период беременности). Обнаружено сходство между однопометниками по величине пальцевого индекса. Выяснено, что на индекс 2D:4D достоверно влияют андрогенный статус матери в период беременности и масса тела матери после родов. Сделан вывод о возможности использовать пальцевой индекс 2D:4D в эколого-популяционных исследованиях как маркер пренатальных гормонально-обусловленных материнских эффектов.

Ключевые слова: водяная полевка, *Arvicola amphibius*, материнский эффект, пальцевой индекс 2D:4D, тестостерон, беременность

DOI: 10.31857/S047514502001005X

ВВЕДЕНИЕ

Изучение морфометрических показателей андрогенизации важно для понимания источников вариабельности морфологических, поведенческих и репродуктивных качеств животных, предупреждения патологических состояний (Jeevanandam, Muthu, 2016). Пальцевой индекс, или отношение длин второго и четвертого пальцев (2D:4D), был изначально предложен психологом Д.Т. Мэннингом как оригинальный морфометрический показатель кисти руки человека (Manning et al., 1998) и широко используется в антропологии как маркер пренатальной андрогенизации (Бутовская и др., 2015). Морфогенез пальцев, по-видимому, имеет консервативную природу и подобное отношение длин пальцев 2D:4D обнаружено у многих животных разных видов (Хайруллин и др., 2013). Одни и те же семейства Hox-генов у людей и мышей вовлечены в андроген-зависимое развитие гениталий и морфогенез пальцев (Peichel et al., 1997). Однако, существуют противоречивые данные относительно половых различий по пальцевому индексу у приматов (Nelsom, Shulz, 2010) и грызунов (Yan et al., 2009; Brown et al., 2002a; Auger et al., 2013). У разных видов индекс 2D:4D выше у самцов или у самок, или же половые отличия по индексу 2D:4D отсутствуют (Хайруллин и др., 2013).

Поскольку большинство половых различий у млекопитающих возникают под воздействием андрогенов (Breedlove et al., 1998) и пальцевой индекс 2D:4D существенно не меняется после пубертации (Manning et al., 1998; Zheng, Cohn, 2011), то длина пальцев может определяться пренатальным уровнем тестостерона. Это предположение подтверждает наличие маскулинизированного индекса 2D:4D у людей с врожденной гиперплазией коры надпочечников (Brown et al., 2002b). Тестостерон во многих исследованиях также связан с асимметричным развитием. Кортикальная и гиппокампальная асимметрия чаще встречается у самцов и более выражена с правой стороны (Tan, Kutlu, 1993; Wisniewski, 1998; Tabibnia et al., 1999). И половой диморфизм по пальцевому индексу 2D:4D наиболее выражен на правой конечности как у людей

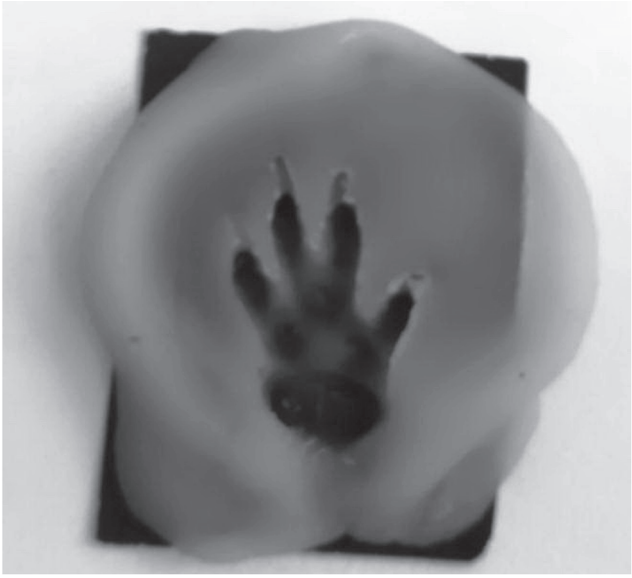

Рис. 1. Отпечаток правой кисти для измерения длин пальцев.

(Manning et al., 1998), так и у мышей (Brown et al., 2002a).

Пальцевой индекс 2D:4D также может отражать пренатальный эффект эстрогенов (Lutchmaya et al., 2004). Экспериментальные работы на крысах (Talarovicova et al., 2009; Auger et al., 2013) и мышах (Zheng, Cohn, 2011) подтвердили, что пальцевой индекс 2D:4D контролируется балансом андрогенов и эстрогенов, взаимодействующих с соответствующими рецепторами в короткий промежуток эмбриогенеза. У мышей половой диморфизм по индексу 2D:4D проявляется с 17 дня эмбрионального развития (Zheng, Cohn, 2011). Ксеноэстрогены *in vitro* и *in utero* влияют на развитие скелета у самцов, приводя к феминизации индекса 2D:4D (Auger et al., 2013).

У водяной полевки (*Arvicola amphibius* L.) содержание тестостерона в крови самок повышается в период беременности (Южик и др., 2013). Известно также, что на андрогензависимые признаки самцов влияют физические кондиции матери во время беременности (Назарова, Евсиков, 2010). Индекс 2D:4D у водяной полевки ранее не оценивался. Неизвестны взаимоотношения между физическими кондициями беременных самок и выработкой у них половых гормонов, а также взаимосвязь физических кондиций матери с пальцевым индексом 2D:4D.

Цель работы – оценить пальцевой индекс 2D:4D у самцов и самок водяной полевки и найти зависимость этого показателя от пола и морфофизиологических характеристик матери (масса тела после родов, уровень тестостерона в период беременности).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия содержания и разведения

Работа выполнена на животных лабораторной колонии вивария Института систематики и экологии животных СО РАН, основателями которых были особи, отловленные в 1984 г. в районе проведения многолетнего эколого-генетического мониторинга циклирующей популяции водяной полевки (д. Лисьи Норки Убинского района Новосибирской области). Группа этих животных поддерживается контролируемым размножением и регулярным, через каждые 1–3 года, пополнением особями из природных популяций для ограничения инбридинга. Животных содержали в индивидуальных клетках (25 × 25 × 48 см) при естественном фотопериоде, температуре 18–25°C, свободном доступе к воде и корму (зерновая смесь, морковь, проростки овса, пшеницы).

В работе использованы детеныши из 11 пометов разных матерей 1–2 летнего возраста, всего 19 самцов и 24 самки. Из них до возраста 1 год дожили 33 животных (16 самок и 17 самцов). Оценку пальцевого индекса проводили в возрасте 10 недель и повторно, через 1 год.

Измерение длины пальцев

Измерения длин пальцев проводили на отпечатках кисти правой передней конечности по методике Gooderham et al., 2012. Для получения отпечатков использовали пластилин Play-Doh™ (23845; Hasbro), Из пластилина изготавливали диски диаметром 15 мм, толщиной 1 мм и прикрепляли их на листы картона. Отпечаток получали, прижимая кисть к диску, распределяя физические усилия равномерно по всем пальцам. Для каждого животного было сделано по 2–3 отпечатка. Измерения проводили в течение 10–15 мин после получения отпечатков под микроскопом МБИ-10 с помощью электронного штангенциркуля (точность измерения 0.01 мм). Длину пальцев измеряли от головки дистальной фаланги до основания проксимальной фаланги (рис. 1). На каждом отпечатке измерение длин пальцев повторяли три раза для точности, затем рассчитывали среднее. Пальцевой индекс рассчитывали как отношение длин второго и четвертого пальцев.

Измерение уровня тестостерона

Уровень тестостерона в крови матерей определяли на 17–19 день беременности. Кровь брали из ретроорбитального синуса. Из крови выделяли сыворотку, затем ее хранили в пластиковых микропробирках при –20°C до определения в ней концентрации гормона. Определение концентрации тестостерона в сыворотке крови осуществляли с помощью набора реагентов для иммунофермент-

Таблица 1. Оценка эффектов факторов раннего развития на пальцевой индекс D2:D4 у водяной полевки (результаты GLM)

Эффекты	*df*	Лог-правдоподобие	χ^2	*P*
Свободный член	1	42.46		
Тестостерон матери	1	52.46	19.99	<0.001
Размер помета	1	53.51	2.11	0.15
Соотношение полов	1	53.52	0.02	0.90
Масса тела матери	1	56.0	4.98	0.03
Идентификационный номер помета	6	62.68	13.35	0.04

ного анализа (ЗАО “Вектор-Бест”, г. Новосибирск). Чувствительность набора 0.2 нмоль/л, коэффициент вариации не превышает 8%. Концентрацию определяли по калибровочной кривой после измерения оптической плотности раствора с образцами сыворотки при основной длине волны 450 нм и референтной длине волны 620 нм.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью программы “Statistica 6.1”. Для оценки влияния пола использовали однофакторный дисперсионный анализ. Влияние факторов пренатального развития на отношение длин пальцев в возрасте 10 нед. устанавливали с помощью множественного регрессионного анализа, применяя обобщенную линейную модель I типа (GLM). В качестве факториальной переменной использовали идентификационный номер помета, непрерывных предикторных – массу тела матери после родов, содержание тестостерона в ее крови, величину помета при рождении и долю самцов среди новорожденных. Функция связи – логарифм. Для оценки сходства пальцевого индекса в разном возрасте – 10 недель и одного года, а также выяснения долговременных эффектов на этот признак андрогенного статуса матери использовали корреляционный анализ.

В тексте и таблицах приведены средние значения признаков (X), стандартная ошибка (±SE) и объем выборок (*n*). Уровень статистической значимости принят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения индекса 2D:4D у самцов (1.003 ± 0.020) и самок (0.998 ± 0.020) соответствуют диапазону значений индекса 2D:4D у других видов (Хайруллин и др., 2013). Статистический анализ данных показал, что влияние пола на отношение длин пальцев недостоверно ($F_{1.41} = 0.03$, $p = 0.86$), и далее его не учитывали. Установлено, что на пальцевой индекс достоверно влияют только идентификационный номер помета, андрогенный статус матери и масса тела матери после родов (табл. 1).

Для всей популяции потомков обнаружена отрицательная корреляция пальцевого индекса 2D:4D с уровнем тестостерона в крови матери в период беременности ($r = -0.61$, $p < 0.001$) и положительная с массой тела матери после родов ($r = 0.39$, $p = 0.01$), рис. 2. Корреляция тестостерона матери с ее массой тела недостоверна: $r = 0.35$, $p = 0.29$.

Выявлена достоверная корреляция между пальцевым индексом особей в возрасте 10 недель и одного года ($r = 0.40$, $p < 0.05$) и установлена связь отношения длин второго и четвертого пальцев во взрослом состоянии с содержанием тестостерона в крови матери в период беременности ($r = -0.45$, $p < 0.01$).

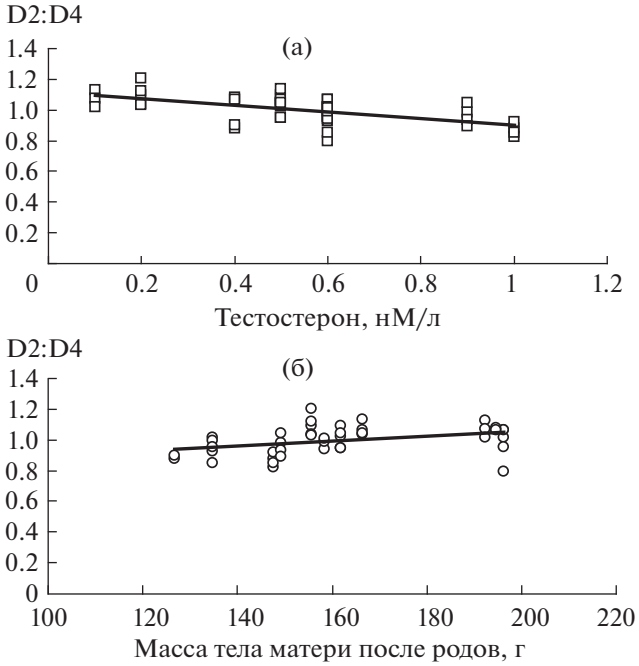

Рис. 2. Корреляция между пальцевым индексом D2:D4 и (а) содержанием тестостерона в крови матери на 17–19 день беременности; (б) массой тела матери после родов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерений пальцевого индекса 2D:4D у водяной полевки показали отсутствие полового диморфизма по этому показателю, что соответствует сведениям, полученным на инбредных мышах (Bailey et al., 2005), красной белке (Gooderham et al., 2012) и пашенной полевке (Lilley et al., 2010). Отсутствие полового диморфизма принято связывать с внутриутробной циркуляцией тестостерона между эмбрионами разного пола у многоплодных млекопитающих (Bailey et al., 2005).

По пальцевому индексу обнаружено сходство между особями одного помета и выяснено, что этот показатель зависит от гормонального статуса и физического состояния матери. Полученный результат согласуется с выводами других авторов о значительном вкладе генетических факторов в дисперсию отношения длин второго и четвертого пальцев. У людей влияние генотипа составляет 50–66% (Paul et al., 2006; Voracek et al., 2009).

Тестостерон во время беременности синтезируется фетоплацентарным комплексом, яичниками матери, надпочечниками и жировой тканью (Caanen et al., 2016). Ранее мы выяснили, что у водяной полевки в период беременности содержание тестостерона в крови повышается пропорционально числу живых эмбрионов, что указывает на его значимую роль в поддержании беременности (Южик и др., 2013, 2015). С величиной помета у водяной полевки положительно связано аногенитальное расстояние (Назарова, Евсиков, 2010), андрогензависимый признак (Dean, Sharpe, 2013).

В данном исследовании установлена отрицательная корреляция между уровнем тестостерона в крови матери на поздней стадии беременности и индексом 2D:4D потомства в возрасте 10 недель и одного года, что согласуется со сведениями об андрогензависимом развитии скелета конечностей и соответствует подобным корреляциям, найденным у людей и других видов животных (Manning et al., 1998; Zheng, Cohn, 2011). В исследованиях на молекулярном уровне, выполненных другими авторами, установлено, что пренатальный тестостерон связан с экспрессией генов HOX A и HOD A. Гены HOX A высоко консервативны у млекопитающих и вовлечены в процесс дифференцировки пальцев. Они также участвуют в определении пола, морфогенезе мочеполовой системы, фертильности и кроветворении (Zhang et al., 2013).

У водяной полевки обнаружена положительная связь между физическим состоянием матери, оцениваемом по массе тела после родов, с индексом D2:D4. Корреляция между массой тела матери и содержанием тестостерона в крови оказалась статистически незначима. Вероятно, другие гормоны, кроме тестостерона, опосредуют влияние физического состояния матери на морфометрические характеристики пальцев. Например, у пашенной полевки (*Microtus agrestis* (L., 1761)) пальцевой индекс положительно коррелирует с содержанием кортикостерона в крови матери перед зачатием (Lilley et al., 2010). На людях и птицах показано, что феминизация пальцевого индекса вызывается повышенным содержанием эстрадиола (Robinson et al., 2000; Saino et al., 2007).

Андрогенный статус матери оказывает программирующее влияние не только на морфологическое развитие, но и на иммунитет и поведение взрослого потомства. Например, у пашенной полевки с увеличением пальцевого индекса D2:D4 возрастает риск заражения эндопаразитами (Navarro et al., 2007; Lilley et al., 2010).

Обобщая собственные результаты и сведения литературы, можно сделать вывод, что пальцевой индекс может быть использован в эколого-популяционных исследованиях как удобный маркер пренатальных гормонально-обусловленных материнских эффектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят рецензентов за ценные замечания и пожелания по доработке рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по Программе ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. (проект № VI.51.1.8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Г.Г. Назарова – планирование эксперимента, взятие отпечатков и измерение длин пальцев, статистическая обработка данных, участие в написании текста статьи; Л.П. Проскурняк – разведение животных; Е.И. Южик – взятие крови, определение уровня тестостерона, участие в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бутовская М.Л., Буркова В.Н., Феденок Ю.Н. Пальцевой индекс как индикатор пренатальной андрогенизации и его связь с морфометрическими и пове-

денческими характеристиками у человека // Этнографическое обозрение. 2015. № 2. С. 99–116.

Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Физическое состояние матери в период беременности и половое созревание потомков-сыновей водяной полевки *Arvicola terrestris* // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 2. С. 143–147.

Хайруллин Р.М., Филиппова Е.Н., Бутов А.А. и др. Линейные зависимости значений пальцевого (2D:4D) индекса у лиц мужского пола // Вестник Московского университета. Серия 23. Антропология. 2011. № 2. С. 16–24.

Хайруллин Р.М., Фомина А.В., Айнуллова Н.К. Вариабельность значений 2D:4D пальцевого индекса у диких и лабораторных животных // Фундаментальные исследования. 2013. № 6. С. 611–618.

Южик Е.И., Проскурняк Л.П., Назарова Г.Г. Динамика морфофизиологических показателей самок водяной полевки (*Arvicola amphibious* L.) в период беременности // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2013. Т. 49. № 4. С. 290–295.

Южик Е.И., Проскурняк Л.П., Назарова Г.Г. Корреляции репродуктивных показателей самок водяной полевки (*Arvicola amphibious*) с морфометрическими и гормональными характеристиками // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2015. Т. 51. № 2. С. 122–126.

Auger J., Le Denmat D., Berges R. et al. Enviromental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny // Proc. R. Soc. B. 2013. V. 280. № 1768. P. 20131532.

Bailey A.A., Wahlsten D., Hurd P.L. Digit ratio (2D:4D) and behavioral differences between inbred mouse strains // Genes Brain Behav. 2005. V. 4. P. 318–323.

Breedlove S.M., Cooke B.M., Jordan C.L. The orthodox view of sexual differentiation of the brain // Brain Behav. Evol. 1998. V. 54. P. 8–14.

Brown W.M., Finn C.J., Breedlove S.M. Sexual dimorphism in digit-length ratios of laboratory mice // Anat. Rec. 2002a. V. 267. № 3. P. 231–234.

Brown W.M., Hines M., Fane B. et al. Masculinized finger length patterns in human males and females with congenital adrenal hyperplasia // Horm. Behav. 2002b. V. 42. № 4. P. 380–386.

Caanen M.R., Kuijper E.A., Hompes P.G. et al. Mass spectrometry methods measured androgen and estrogen concentrations during pregnancy and in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome // Eur. J. Endocrinol. 2016. V. 174. P. 25–32.

Dean A., Sharpe R.M. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. V. 98. № 6. P. 2230–2238.

Jeevanandam S., Muthu P.K. 2D:4D ratio and its implications in medicine // J. Clinic. Diagnos. Res. 2016. V. 10. № 12. P. CM01–CM03.

Gooderham K.L., Schulte-Hostedde A.I. Does 2D:4D predict fitness in a wild mammal? // Can. J. Zool. 2012. V. 90. P. 93–100.

Lutchmaya S., Baron-Cohen S., Raggatt P. et al. 2nd to 4th digit ratios, fetal testosterone and estradiol // Early Human Development. 2002. V. 77. P. 23–28.

Lilley T., Laaksonen T., Huitu O., Helle S. Maternal corticosterone but not testosterone level is associated with the ratio of second-to-fourth digit length (2D:4D) in field vole offspring (*Microtus agrestis*) // Physiol. Behav. 2010. V. 99. P. 433–437.

Manning J.T., Scott D., Wilson J. et al. The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, lutenizing hormone and oestrogen // Hum. Repeod. 1998. V. 1311. P. 3000–3004.

Mills S.C., Grapputo A., Jokinen I. et al. Testosterone-mediated effects on fitness-related phenotypic traits and fitness // Am. Nat. 2009. V. 173. № 4. P. 475–487.

Navarro C., Lope F.D., Moller A.P. Digit ratios (2D:4D), secondary sexual characters and cell-mediated immunity in house sparrows *Passer domesticus* // Behav. Ecol. 2007. V. 61. № 8. P. 1161–1168.

Nelson E., Shultz S. Finger length ratios (2D:4D) in anthropoids implicate reduced prenatal androgens in social bonding // Am. J. Phys. Anthropol. 2010. V. 141. P. 395–405.

Peichel C.L., Prabhakaran B., Voght T.F. The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior *HoxD* gene expression and alters appendicular patterning // Development. 1997. V. 124. P. 3481–3492.

Robinson S.J., Manning J.T. Ratio of 2nd to 4th digit length and male homosexuality // Evol. Hum. Behav. 2000. V. 21. № 5. P. 333–345.

Saino N., Rubolini D., Romano M., Boncoraglio G. Increased egg estradiol concentration feminizes digit ratios of male pheasants (*Phasianus colchicus*) // Naturwissenschaften. 2007. V. 94. № 3. P. 207–212.

Tabibnia G., Cooke B.M., Breedlove S.M. Sex difference and laterality in the volume of the mouse dentate gyrus granule cell layer // Brain Res. 1999. V. 827. P. 41–45.

Tan U., Kutlu N. Relationships among weights of right and left cerebral hemispheres and right minus left brain weight in right- and left-pawed male and female cats: importance of body weight // Int. J. Neurosci. 1993. V. 691. P. 53–66.

Voracek M., Dressler S.G. Brief communication: Familial resemblance in digit ratio (2D:4D) // Am. J. Phys. Anthropol. 2009. V. 140. № 2. P. 376–380.

Paul S.N., Kato B.S., Cherkas L.F. Andrew T., Spector T. Heritability of the second to fourth digit ratio (2D:4D): a twin study // Twin Res. Hum. Gen. 2006. V. 9. № 2. P. 215–219.

Wisniewski A.B. Sexually-dimorphic patterns of cortical asymmetry, and the role for sex steroid hormones in determining cortical patterns of lateralization // Psychoneuroendocrinology. 1998. V. 235. P. 519–547.

Yan R.H.Y., Bunning M., Wahlsten D. et al. Digit ratio (2Dratio4D) differences between 20 strains of inbred mice // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. 5801.

Zhang C., Dang J., Pei L., et al. Relationship of 2D:4D finger ratio with androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphism // Am. J. Hum. Biol. 2013. V. 25. № 1. P. 101–106.

Zheng Z., Cohn M.J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios // PNAS USA. 2011. V. 108. № 39. P. 16289–16294.

Dependence of the Ratio of the Lengths of the Second and Fourth Fingers (2D:4D) on the Conditions of Prenatal Development in a Water Vole (*Arvicola amphibius* L.)

G. G. Nazarova[1, *], L. P. Proskurnyak[1], and E. I. Yuzhik[1, 2, **]

[1]*Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the RAS, Biological Sciences, ISEA SB RAS, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia*

[2]*Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology – Subdivision of FRC FTM, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

**e-mail: galinanazarova@mail.ru*

***e-mail: infuturo@mail.ru*

Received March 12, 2019; revised September 25, 2019; accepted September 30, 2019

The ratio of the lengths of the second and fourth fingers (2D:4D) is used as a marker of prenatal androgenization. A similar ratio of finger lengths 2D:4D was found in humans and many animal species. Morphological markers of prenatal effects are important in population studies. We measured the digital index 2D:4D in males and females of a water vole (*Arvicola amphibius* L.). The analysis of the dependence of this indicator on gender and the morphophysiological characteristics of the mother (body weight after parturition, testosterone level during pregnancy) is carried out. A similarity was found between littermates in terms of finger index. It was found out that the androgen status of the mother during pregnancy and the body weight of the mother after childbirth reliably affect the 2D:4D index. The conclusion is made about the possibility of using the 2D:4D finger index in environmental population studies as a marker of prenatal hormone-related maternal effects.

Keywords: water vole, *Arvicola amphibius*, maternal effect, finger index 2D:4D, testosterone, pregnancy