

СОДЕРЖАНИЕ

Том 53, номер 5, 2022

ОБЗОРЫ

Прямые и наследуемые эпигенетические изменения в нервной системе, вызванные интенсивной локомоцией: возможное адаптивное значение

М. И. Межеричкий, В. Е. Дьяконова 317

Семейство канальных белков с транзиторным рецепторным потенциалом – TRP

Е. Е. Куваева, И. Б. Мерцалов, О. Б. Симонова 332

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние линолевой кислоты на криоконсервацию полученных путем ЭКО эмбрионов домашней кошки

С. В. Окотруб, Д. А. Лебедева, К. А. Окотруб, Э. А. Чуйко, Е. Ю. Брусенцев, Т. А. Рахманова, С. Я. Амстиславский 345

Особенности роста синего краба *Paralithodes platypus* в северной части Охотского моря

Д. В. Артеменков, С. В. Клинушкин, А. В. Харитонов, Д. О. Сологуб 358

Экспрессия гена половой плазмы *germes* в фолликулярных клетках ооцита *X. laevis*

В. В. Кондукторова, Н. Н. Лучинская, А. В. Белявский 375

Зависимость продолжительности отдельных периодов митотического цикла от голоплоидного содержания ДНК в апикальных меристемах корней

Н. В. Жуковская, В. Б. Иванов 388

Contents

Vol. 53, No. 5, 2022

REVIEWS

Long-Term and Inherited Behavioral Changes Induced by Intense Locomotion:
Epigenetic Mechanisms and Possible Adaptive Implications

M. I. Mezheritskiy and V. E. Dyakonova

317

Transient Receptor Potential Family of Channel Proteins – TRP

E. E. Kuvaeva, I. B. Mertsalov, and O. B. Simonova

332

RESEARCH PAPERS

Effects of Linoleic Acid on Cryopreservation of IVF-Obtained Domestic Cat Embryos

*S. V. Okotrub, D. A. Lebedeva, K. A. Okotrub, E. A. Chuyko, E. Yu. Brusentsev,
T. A. Rakhmanova, and S. Ya. Amstislavsky*

345

Growth Features of Blue King Crab *Paralithodes platypus* in the Northern Part of the Sea of Okhotsk

D. V. Artemenkov, S. V. Klinushkin, A. V. Kharitonov, and D. O. Sologub

358

The Expression of Germ Plasm Gene *Germes* in Follicular Cells of *X. Laevis* Oocyte

V. V. Konduktorova, N. N. Luchinskaya, and A. V. Belyavsky

375

Dependence of the Duration of Single Periods of the Mitotic Cycle on the Holoploid DNA Content
in the Root Apical Meristems

N. V. Zhukovskaya and V. B. Ivanov

388

УДК 577.21,577.24,577.25,577.3

ПРЯМЫЕ И НАСЛЕДУЕМЫЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ, ВЫЗВАННЫЕ ИНТЕНСИВНОЙ ЛОКОМОЦИЕЙ: ВОЗМОЖНОЕ АДАПТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

© 2022 г. М. И. Межеричкий^а, *, В. Е. Дьяконова^а, **^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: labor405@gmail.com

**e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 03.05.2022 г.

Принята к публикации 10.05.2022 г.

Обзор посвящен анализу работ, исследовавших долговременные и передающиеся следующему поколению влияния видоспецифичных форм интенсивной локомоции на когнитивные функции животных и человека. На сегодняшний день анксиолитические и благоприятствующие выполнению когнитивных функций длительные эффекты интенсивной локомоции продемонстрированы у человека, грызунов, рыб, насекомых, моллюсков и нематод. У грызунов изменения в ЦНС, вызванные интенсивной локомоцией, передаются по материнской и по отцовской линии потомкам первого поколения. К ним относятся снижение тревожности, улучшение пространственного обучения и памяти, повышение уровня нейротрофического фактора мозга и фактора роста эндотелия сосудов в гиппокампе и фронтальной коре. Смещение баланса ацетилирования гистонов в гиппокампе грызунов в сторону гиперацетилирования, и баланса метилирования ДНК в сторону деметилирования проявляется и как прямой, и как наследуемый первым поколением эффект двигательной активности. Вопрос о том, какие механизмы связывают локомоцию с повышением пластичности генома мозга потомков остается малоисследованным, идеальными объектами для его изучения могут стать беспозвоночные модельные организмы. В настоящее время не хватает теоретической модели, объясняющей, почему двигательная активность приводит к длительному и передающемуся следующему поколению улучшению некоторых когнитивных функций, и почему такое влияние могло сформироваться в эволюции. Ответ на эти вопросы представляет не только фундаментальный интерес, он необходим для прогнозирования терапевтических, а также возможных побочных эффектов двигательной нагрузки у человека. В связи с этим в статье особое внимание уделено обзору идей, посвященных эволюционным аспектам проблемы. Мы предлагаем собственную гипотезу, в соответствии с которой активирующее влияние интенсивной локомоции на работу нервной системы могло сформироваться в эволюции как преадаптация к возможному попаданию в новую среду.

Ключевые слова: двигательная активность, локомоция, память, обучение, нейрогенез, эпигенетика

DOI: 10.31857/S0475145022050056

ВВЕДЕНИЕ

О наличии положительного влияния моторной нагрузки на когнитивные функции и эмоциональную регуляцию как у здоровых людей, так и при патологиях нервной системы, известно давно. Относительно недавние работы, опирающиеся на данные мета-анализов (Beckett et al., 2015; Basso, Suzuki, 2017; Valenzuela et al., 2020), подтверждают это представление. В них убедительно показано улучшение памяти, повышение способности к обучению, снижение тревожности и облегчение симптомов депрессии. Анксиолитические и благоприятствующие выполнению когнитивных

функций эффекты интенсивной локомоции продемонстрированы не только у человека, но и у грызунов (da Costa et al., 2020), рыб (Mes et al., 2020), насекомых (Stevenson et al., 2005; Mezheritsky et al., 2020), моллюсков (Korshunova et al., 2016), нематод (Laranjeiro et al., 2017, 2019; Kumar et al., 2021). Эти факты свидетельствуют о том, что связь движение – когнитивные функции сформировалась рано в эволюции и имеет адаптивное значение у далеких в систематическом отношении видов животных.

С 2016 г. мы разрабатываем представление (Korshunova et al., 2016; Dyakonova et al., 2019; Aonuma et al., 2020; Mezheritsky et al., 2020), со-

гласно которому изменения в состоянии и поведении организма, вызванные интенсивной локомоцией, действительно, имеют биологическое и физиологическое значение. Сопутствующая движению активация когнитивных функций вполне объяснима необходимостью быстрее реагировать на более быструю смену окружающих условий. Но эффекты, которые сохраняются на длительное время или проявляются через некоторый промежуток времени, с трудом объясняются физиологическими изменениями, направленными на реализацию текущего поведения. Мы предполагаем, что такие влияния сформировались в эволюции как упреждающая адаптация или преадаптация к возможному попаданию в новую среду, поскольку сама по себе интенсивная локомоция могла приводить к тому, что животные оказывались в менее знакомых для себя условиях. Выживание в новой среде безусловно требует активации и когнитивных, и моторных функций.

В последнее десятилетие появилось много работ, свидетельствующих о существовании отставленных и даже отдаленных в индивидуальном развитии эффектах повышенной двигательной активности как у человека, так и у других животных, включая некоторых беспозвоночных. Кроме того, показано, что двигательная активность родителей отражается на функционировании нервной системы потомков. Предполагается, что важную роль в этих эффектах играют эпигенетические механизмы, связанные с изменением метилирования ДНК, а также ацетилирования и метилирования гистонов в различных областях мозга и клетках зародышевой линии. Анализу долговременных и передающихся следующему поколению влияний интенсивной локомоции на когнитивное и эмоциональное поведение, а также возможным механизмам сохранения этих вызванных изменений в нервной системе посвящен наш обзор.

В первой главе мы рассмотрим данные об отставленных (часы и дни) и отдаленных (месяцы и годы) влияниях интенсивной двигательной активности на работу нервной системы. Вторая глава будет посвящена анализу возможных эпигенетических механизмов, обуславливающих такие долговременные изменения. В третьей главе будут рассмотрены работы, посвященные эпигенетическому наследованию изменений, вызванных интенсивной локомоцией по материнской и по отцовской линии и его механизмам. В заключительной главе мы обсудим гипотезы об адаптивном смысле долговременных и передающихся по наследству изменений в ЦНС, вызванных интенсивной локомоцией, а также перспективы для изучения клеточных и молекулярных механизмов этой поведенческой модуляции.

ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОВЕДЕНИИ И ЦНС, ВЫЗВАННЫЕ ИНТЕНСИВНОЙ ЛОКОМОЦИЕЙ

На грызунах было неоднократно показано, что предшествующая локомоция положительно влияет на обучение и память как здоровых животных, так и животных с вызванными нейродегенеративными заболеваниями (Anderson et al., 2000; Laurence et al., 2015; мета-анализ da Costa et al., 2020). Уже прошло более двадцати лет с момента открытия клеточного механизма, связанного с упреждающей активацией этих когнитивных функций интенсивным движением (van Praag et al., 1999a, 1999b; van Praag, 2008). Таким механизмом оказалось вызванное бегом усиление нейрогенеза в гиппокампе, появление новых нейронов, способствующих формированию новых клеточных ансамблей. Позже было показано, что двигательная активность вызывает изменения в серотонинергической, дофаминергической, норадренергической, ацетилхолинергической, орексинергической и эндоканабиноидной нейротрансмиттерных системах (Lin, Kuo., 2013; Chieffi et al., 2017; Watkins, 2018), а также влияет на факторы роста, такие как нейротрофический фактор мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста-1 и фактора роста эндотелия сосудов (Trejo et al., 2001; Fabel et al., 2003; Pietrelli et al., 2018). При этом быстрое и отставленное влияние интенсивной локомоции на эти сигнальные системы может отличаться (подробнее см. обзор Heijnen et al., 2016). Одним из центральных нейроактивных веществ, обеспечивающих эффекты интенсивной двигательной активности у млекопитающих, является серотонин (Klempin et al., 2013; Kondo, Shimada, 2015). Анализ на клеточном уровне показал, что двигательная нагрузка повышает экстраклеточное содержание серотонина по механизму, сходному с действием фармакологических антидепрессантов — ингибиторов обратного захвата серотонина (Baganz et al., 2010). При этом ключевая роль отводится ауторецепторам 5-HT_{1A} (Baganz et al., 2010).

Продолжительное, сохраняющееся до нескольких часов влияние интенсивной локомоции на поведение и когнитивные функции найдено также у некоторых первичноротых организмов. Так у моллюска *Lymnaea stagnalis* показано облегчение принятия решения в новой среде спустя 2 часа после интенсивного мышечного ползания в условиях мелководья. Животные на сухой асимметрично освещенной арене совершали меньше ориентировочных поворотов перед выбором направления движения (Aonuma et al., 2020). Этот результат согласуется с данными биохимических и электрофизиологических исследований в серотонинергической системе этих животных (Dyakonova et al., 2019; Aonuma et al., 2020). Двухчасовой отдых после интенсивной локомоции проявлялся в

изменениях метаболизма серотонина и электрической активности серотониновых мотонейронов. На этой модели впервые показано изменение биофизических свойств серотонинергических нейронов в условиях полной изоляции из нервной системы как еще один пример отставленных эффектов интенсивной локомоции (Dyakonova et al., 2019). У нематоды *C. elegans* также показаны не только быстрые, но и проявляющиеся через несколько часов и даже месяцев эффекты видоспецифичной интенсивной локомоции – плавания (Laranjeiro et al., 2017, 2019; Kumar et al., 2021). Так, однократный опыт плавания в течение 90 мин увеличивал продолжительность жизни (Laranjeiro et al., 2017), четырехкратный опыт плавания приводил к улучшению обучения и памяти (Laranjeiro et al., 2019), показана также более быстрая регенерация поврежденных аксонов у физически-активных нематод (Kumar et al., 2021).

На грызунах исследуются не только отставленные (часы и дни), но и отдаленные во времени (месяцы и годы) эффекты двигательной активности. В одном из таких исследований (Merkley et al., 2014) было показано, что ранний жизненный опыт, такой как период добровольного бега у молодых крыс (возраст – один месяц), может изменить протекание взрослого нейрогенеза на оставшуюся часть жизни животного. У бегавших животных повысилась скорость созревания и увеличилась выживаемость новых нейронов при неизменном количестве пролиферирующих нейрональных предшественников. Этот эффект сохранялся вплоть до 11-месячного возраста, что было последней исследованной точкой в онтогенезе этих животных в обсуждаемой работе. В другом исследовании (Shevtsova et al., 2017) на большой выборке животных ($n = 80$, молодые крысы, без уточнения генетической линии) было еще раз подтверждено, что взрослый нейрогенез играет существенную роль в обучении и памяти, а также показано, что физическая активность в раннем возрасте оказывает положительное влияние на когнитивные процессы в последующей жизни.

В исследованиях на людях также растет число работ, в которых внимание уделяется отдаленному влиянию физической активности в молодом возрасте на здоровье мозга и когнитивные функции в пожилом. В одном из таких исследований (Middleton et al., 2010) участвовало 9344 женщины, средний возраст которых составлял 72 г. Авторы заключили, что у женщин, которые вели более активный образ жизни в подростковом возрасте, были менее выражены когнитивные ухудшения в 30, 50 лет и пожилом возрасте. Исследователи отметили именно подростковый возраст, как самый значимый для последующей когнитивной сохранности.

Вопрос о том, насколько сходны физиологические и молекулярные механизмы длительных поведенческих эффектов интенсивной локомоции у разных видов, остается открытым. Между тем, выявление общих между человеком и доступными лабораторными моделями физиологических, биохимических и генетических механизмов, особенно относящихся к передовому краю медицинских исследований, потенциально способно облегчить разработку новых методов терапии неврологических и психических расстройств. Некоторые трудности для трансляционного подхода уже очевидны. Если у грызунов большую роль в обеспечении когнитивных эффектов после двигательной нагрузки играет активация взрослого нейрогенеза, то у человека участие этого механизма остается под вопросом. Все большее число исследователей склоняется к представлению об отсутствии нейрогенеза во взрослом мозге человека (Franjic et al., 2021). По той же причине активацией нейрогенеза нельзя объяснить и длительные когнитивные эффекты интенсивной локомоции у некоторых беспозвоночных, например, моллюска и нематоды. Но и у грызунов, нейрогенез не объясняет всецело бенефициарные когнитивные эффекты бега. Так в работе (Choi et al., 2018) было показано, что только при дополнительном введении мозгового фактора роста (BDNF) повышенный нейрогенез приводит к достоверному улучшению обучения, сходного с результатом бега.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ МОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НА ФУНКЦИИ МОЗГА

Все большее число исследований указывает на участие эпигенетических механизмов в длительных эффектах моторной активности на мозг, которые играют важную роль в регуляции синаптической пластичности, обучении и памяти (Gomez-Pinilla et al., 2011; Abel, Rissman, 2013; Ieraci et al., 2015). Одной из задач эпигенетики является изучение молекулярных механизмов модуляции экспрессии генов через модификацию хроматина, путем метилирования ДНК, ацетилирования и метилирования гистонов, а также множества других химических влияний (Jones, Takai, 2001; Jaenisch, Bird, 2003; Goldberg et al., 2007). Большинство эпигенетических регуляторов относится к эволюционно-консервативным молекулам. Группы малых некодирующих РНК – микроРНК – также рассматриваются в качестве мощных эпигенетических регуляторов пластичности мозга и механизмов памяти (Konopka et al., 2010; Wang et al., 2012; Saab, Mansui, 2014). Впервые микроРНК были идентифицированы как регуляторы развития у *C. elegans* (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000). Короткие некодирующие РНК затем были обнару-

жены и у других организмов (Pasquinelli et al., 2000).

Экспрессия генов зависит от состояния хроматина. Реорганизация хроматина возможна благодаря присоединению-удалению химических групп к гистонам ($\text{CH}_3\text{CO}-$; CH_3- и др.) и ДНК (CH_3-). Это происходит за счет регулирующих ферментов, таких как гистоновые ацетилтрансферазы (НАТ) и гистоновые деацетилазы (HDAC). НАТ, как правило, активирует транскрипцию генов, тогда как HDAC подавляет. В нейронах имеет место тонкий баланс между активностью НАТ и HDAC, оказывающих противоположное влияние на состояние хроматина и, следовательно, экспрессию генов. Например, при нейродегенерации происходит критическая потеря НАТ, что отклоняет баланс ацетилирования гистонов в сторону чрезмерного деацетилирования, снижая экспрессию многих генов (Saha, Pahan, 2006). Elsner et al., 2011 предполагают, что нейропротекторные свойства физических упражнений также могут быть связаны с ремоделированием хроматина, в частности с индукцией ацетилирования гистонов посредством модуляции HDAC и НАТ. Было показано, что у стареющих мышей повышен уровень активности HDAC в гиппокампе (Sant' Anna et al., 2013), а ингибирование HDAC в свою очередь стимулировало улучшение памяти (Levenson, Sweatt, 2005; Reolon et al., 2011). Однократный бег снижал активность HDAC, повышал активность НАТ (гистона H4) в гиппокампе крыс сразу и через 1 ч после тренировки, что указывает на состояние гиперацетилирования гистонов. Так же было продемонстрировано, что физическая нагрузка увеличивает фосфоацетилирование гистона H3 в гранулярных нейронах зубчатой фасции гиппокампа (Collins et al., 2009).

Однократная физическая нагрузка увеличивала активность НАТ не только в гиппокампе, но и в лобных отделах коры головного мозга у молодых взрослых крыс, в то время как регулярный бег снижал активность HDAC (Spindler et al., 2014). Лобная кора играет ключевую роль в когнитивных функциях высшего порядка, таких как принятие решений, внимание и рабочая память (Chayer, Freedman, 2001). Активность НАТ в лобных отделах коры увеличивалась через час после однократного бега, тогда как активность HDAC оставалась неизменной. При этом регулярный бег снижал активность HDAC сразу после нагрузки и через час, не влияя на НАТ. Исследование показало, что данная область мозга, как и гиппокамп чувствительна для вызванной упражнениями эпигенетической модуляции (Spindler et al., 2014). Результаты данной работы также согласуются с гипотезой о том, что как однократная, так и продолжительная моторная нагрузка связана с гиперацетилированием гистонов в разных областях мозга.

В дополнение отметим, что у старых крыс также наблюдался более низкий уровень ацетилирования гистона 4, благодаря повышенной активности HDAC в гиппокампе (Lovatel et al., 2013; Sant' Anna et al., 2013) и лобной коре (с учетом времени суток) (Sant' Anna et al., 2013). Тогда как, стабильная физическая нагрузка (по 20 мин в день на протяжении 2 нед.) повышала уровень ацетилирования H4 и положительно влияла на память (Lovatel et al., 2013).

В другом исследовании (Elsner et al., 2017) произвели оценку влияния физической нагрузки на ацетилирование гистонов в стриатуме крыс на разных стадиях развития: в возрасте 39 дней после родов (подростковый период), 3 мес. (молодые взрослые) и 20 мес. (пожилые). Самцов крыс подвергали двум различным протоколам физических упражнений: однократному бегу на беговой дорожке (20 мин) и ежедневному бегу (20 мин в течение 2 нед.). Однократная тренировка индуцировала стойкие эффекты в стриатуме крыс только подростковой группы, снижая активность гистоновых деацетилаз (HDAC) через 1 и 18 ч после тренировок, но не влияя на уровень ацетилирования гистона 4. Ежедневная физическая нагрузка не изменяла ни одного маркера ацетилирования гистонов в подростковой и взрослой группах в разные моменты времени после тренировки. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что физические упражнения влияют на активность HDAC в стриатуме в зависимости от возраста и протокола.

Влияние физических нагрузок на метилирование гистонов исследовано мало. Гистоны могут быть метилированы либо по лизиновым (K), либо по аргининовым (R) остаткам с помощью гистоновых метилтрансфераз (HMTs). Сайт-специфическое метилирование аминокислотных остатков может конденсировать или ослаблять структуру хроматина, например, моно-метилирование гистона H3 при K9 (H3-K9) связано с активацией транскрипции, в то время как ди- и триметилирование H3-K9 – с подавлением (Bannister et al., 2005; Gupta et al., 2010). Elsner et al. (2013) проверили влияние старения и физических нагрузок на уровни ДНК метилтрансфераз (DNMT1 и DNMT3b) и метилирования H3-K9 в гиппокампе у крыс в возрасте 3 и 20 мес. Считается, что DNMT1 поддерживает метилирование в дочерней ДНК после репликации, тогда как DNMT3b катализирует метилирование *de novo* (Bestor, 2000). С другой стороны, DNMT1 также может катализировать *de novo* (Vertino et al., 1996), а DNMT3b и DNMT3a – работать на поддержание метилирования (Rhee et al., 2000). Уровень DNMT1 и метилирования H3-K9 оказался изначально снижен в гиппокампе у зрелых крыс по сравнению с молодыми. Авторы предполагают, что снижение метилирования H3-K9 в гиппокампе у 20-месячных крыс может

быть связано именно с монометилированием H3-K9, указывающим на возрастное снижение транскрипции генов. В ходе эксперимента животные были подвергнуты двум протоколам упражнений: однократному бегу на беговой дорожке (20 мин) и ежедневному бегу (20 мин в течение 2 нед.). Однократное занятие физическими упражнениями снижало уровни DNMT3b и DNMT1 у молодых взрослых крыс без какого-либо эффекта у зрелых животных. Оба протокола тренировки уменьшили уровни метилирования H3-K9 у молодых, тогда как однократный сеанс бега повышал метилирование H3-K9 у зрелых крыс через час и 18 ч после тренировки. Как было замечено выше, метилирование гистонов может проявлять противоположные эффекты, приводя либо к активации генов, либо к репрессии, в зависимости от типа метилирования, но происходит ли в данном случае моно-, ди- или триметилирование и зависит ли это от возраста остается неясным.

После физической нагрузки у грызунов отмечено также глобальное ацетилирование гистона 3 в промоторных областях BDNF в гиппокампе и деметилирование ДНК в IV промоторной области гена BDNF, что коррелирует с повышением экспрессии BDNF после бега (Gomez-Pinilla et al., 2011; Abel, Rissman, 2013; Ieraci et al., 2015). Экспрессия ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз оказалась снижена (Abel, Rissman, 2013; Ieraci et al., 2015). К тому же две недели физической нагрузки способствовали деметилированию CpG-островков, расположенных на промоторе VEGFA (Sølvsten et al., 2016) фактора роста эндотелия сосудов, играющим, как было описано выше, важную роль в положительном влиянии физических упражнений на нейрогенез.

В работе (Sølvsten et al., 2018) использовали 2-недельный протокол добровольного доступа к беговому колесу для изучения индуцированной физическими упражнениями экспрессии мРНК ряда факторов роста в гиппокампе и лобной коре крыс. Обнаружились различия по BDNF, VEGFA, IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1) и FGF2 (фактор роста фибробластов) в гиппокампе в сравнении с контрольной группой животных. Экспрессия оказалась выше у бегающих крыс. В префронтальной коре по транскриптам BDNF отличия не обнаружались, однако выявилось различие по другим: нейротрофинам: NGF (фактор роста нервов) и FGF2. Также в гиппокампе было зафиксировано повышение экспрессии гена Tet1, кодирующего одноименный белок TET1 из семейства TET, который участвует в процессе деметилирования ДНК (Kriaucionis, Heintz, 2009). При этом уровень DNMT3b был ниже в гиппокампе у физически активных крыс.

Плавание улучшило память крыс, подвергшихся неонатальному введению изофлурана (0.75%) –

препарата, вызывающего нейрокогнитивный дефицит, и индуцировало ацетилирование гистонов H3 (по K9, K14) и H4 (по K5, K8, K12) в гиппокампе (Zhong et al., 2016). Животных тестировали через три месяца после введения изофлурана. Самый стойкий эпигенетический эффект плавания был отмечен на H3K9 и H4K5. Также после двигательной активности в гиппокампе было зафиксировано повышение экспрессии CREB-связывающего белка (CBP), активность которого связана с синаптической пластичностью, долговременной памятью и стимуляцией ацетилирования гистонов (Alarcon et al., 2004; Barrett et al., 2008; Bousiges et al., 2010).

Таким образом, показано, что физическая активность модулирует эпигенетические механизмы, связанные с обучением и памятью, через ацетилирование, главным образом, гистонов 3 (по лизину 4, 5, 14 и чаще всего 9) и 4 (по лизину 5 и меньше по 8 и 12); деметилирование ДНК в промоторных областях генов BDNF и VEGF; повышение уровня гистоновых ацетилтрансфераз (HAT) и наоборот снижению гистоновых деацетилаз (HDAC) и ДНК метилтрансфераз (в особенности DNMT3b). На данный момент роль метилирования и деметилирования гистонов в когнитивных эффектах двигательной активности не вполне ясна.

Ряд исследований подтверждают важную роль микроРНК в когнитивных эффектах интенсивной двигательной активности (Bao et al., 2014; Cosín-Tomás et al., 2014; Hu et al., 2015; Donga et al., 2018). МикроРНК (или miR), как правило, связывают соответствующие мРНК, тем самым подавляя синтез их белков (He, Hannon, 2004), однако могут играть и активирующую роль в экспрессии других генов (Vasudevan et al., 2007). МикроРНК вовлечены в регуляцию множества важнейших процессов в ЦНС, в том числе в связи с когнитивными функциями, модулируя синаптическую пластичность и процессы памяти (Konopka et al., 2010; Wang et al., 2012; Saab, Mansui, 2014; Xia et al., 2018). Так, выявлена компенсация нарушенной черепно-мозговой травмой (ЧМТ) экспрессии микроРНК в гиппокампе у мышей после бега в колесе (Bao et al., 2014). Мышей подвергали ЧМТ и помещали в среду, где был свободный доступ к колесу в течение 2 недель. Показатели обучения и памяти оценивались с помощью теста “водный лабиринт Морриса” (MWM) на 15-й день. Было показано, что двигательная активность привела к восстановлению когнитивного дефицита (Zohar et al., 2003), связанного с ЧМТ и изменению экспрессии микроРНК в гиппокампе. Авторы (Bao et al., 2014) делают вывод о том, что модуляция уровней микроРНК, опосредованная двигательной активностью, может быть вовлечена в когнитивное улучшение у мышей, страдающих ЧМТ. Данные позволяют предположить, что снижение экспрессии miR-21 и miR-34a (возможно в ком-

бинации с другими микроРНК) было связано с процессом когнитивного восстановления после травмы. Результаты следующего исследования согласуются с этим предположением, так отмечено повышение экспрессии miR-21 в гиппокампе мышей с ЧМТ и ее снижение после бега, что в свою очередь коррелировало с улучшением пространственной памяти (Hu et al., 2015). Также была подтверждена связь между увеличением экспрессии miR-34a с нейрокогнитивной дисфункцией, болезнью Альцгеймера (Liu et al., 2012; Cosín-Tomás et al., 2017; Jian et al., 2017; Xua et al., 2018; Sarkar et al., 2019).

Двигательная активность улучшила выполнение когнитивных задач у трансгенной линии быстро стареющих мышей SAMP8, снизив накопление белка APP (предшественник бета-амилоида) и экспрессию miR-132, также, по всей видимости, связанную с регуляцией когнитивных функций (Donga et al., 2018).

Pons-Espinal et al. (2019) показали, что другая микроРНК miR-135 модулирует нейрогенез после физической активности у мышей. Повышенная экспрессия miR-135 в зубчатой фасции гиппокампа предотвращала индуцированную бегом пролиферацию нейрональных предшественников, тогда как ингибирование miR-135 стимулировало пролиферацию, приводя к нейрогенезу (но не астроглиогенезу), в зубчатой фасции даже у мышей без доступа к беговому колесу. Более того, ингибирование miR-135 активировало пролиферацию нейрональных предшественников в зубчатой фасции взрослых мышей (Pons-Espinal et al., 2019).

Повышение секреции определенных нейротрансмиттеров в ответ на усиление локомоции может рассматриваться как пусковой механизм изменений на эпигенетическом уровне. Действительно, для ряда нейротрансмиттеров, вовлеченных в обеспечение моторного поведения, обнаружены возможные эпигенетические мишени действия. Так, глутамат через NMDA и AMPA рецепторы, активацию киназных каскадов и фосфорилирование CREB может влиять на экспрессию генов *gadd45*, кодирующих семейство белков GADD45, задействованных в эпигенетическом контроле генов во время развития нервной системы в онтогенезе и при травмах мозга (Sultan, Sweatt, 2013; Moroz et al., 2021; Dyakonova, 2022).

Серотонин (5-НТ) вовлечен в эпигенетическую регуляцию разными способами. Один из путей воздействия 5-НТ на хроматин реализуется через мембранные рецепторы. Так у улиток рода *Helix* обнаружено, что обучение связано с ацетилизацией и метилированием H3. Неспецифическая блокада серотониновых рецепторов повлекла ухудшение памяти и снижение уровня метилирования и ацетилизации гистонов, тогда как блокада ги-

стоновых деацетилаз предотвращала ухудшение памяти, связанное с введением антагониста серотонина (Grinkevich, Vorobiova, 2014). На *Aplysia* также была продемонстрирована связь между введением 5-НТ, повышением экспрессии мРНК синапсина, изменением активности синапсов и ацетилизацией H3 и H4 (Guan et al., 2002; Hart et al., 2011). Другой путь связан с недавно открытым феноменом серотонилирования в ядре клетки, куда серотонин попадает благодаря ферменту транслугтаминаза 2 (Ivashkin et al., 2019; Farrelly et al., 2019; Voronezhskaya, 2021). В работе (Farrelly et al., 2019) было обнаружено серотонилирование гистона 3 по лутамину 5 (H3Q5ser). H3Q5ser усиливает связывание транскрипционных факторов с хроматином, тем самым активируя экспрессию генов в нервной системе грызунов и человека. Значение серотонилирования в механизме влияния интенсивной локомоции пока остается неизвестным и требует изучения.

МЕЖГЕНЕРАЦИОННОЕ ВЛИЯНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА ФУНКЦИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО МЕХАНИЗМЫ

Передачу потомству эпигенетических изменений, возникших в ответ на средовые стимулы, называют межгенерационным (intergenerational) и трансгенерационным (transgenerational) эпигенетическим наследованием. Между двумя понятиями существуют различия. Средовые факторы, воздействующие на беременных особей женского пола (F0), могут непосредственно влиять не только на развивающийся эмбрион (первое поколение, F1), но и на его половые клетки. В таком случае, эпигенетическая передача каких-либо фенотипических признаков поколению F1 и F2 будет называться межгенерационной. О “чистом” наследовании можно говорить только в случае трансгенерационной передачи и для самок это будет поколение F3. Средовые факторы, воздействующие на самцов (F0), также могут непосредственно влиять на половые клетки, поэтому о “чистом” эпигенетическом (трансгенерационном) наследовании можно говорить только для поколения F2 (Lacal, Ventura, 2018; Perez, Lehner, 2019). В данной работе рассматривается в основном межгенерационная передача, т.к. в литературе трансгенерационное влияние родительской интенсивной двигательной активности на ЦНС изучено крайне мало.

*Пренатальная физическая активность самок
влияет на поведенческий фенотип
и когнитивные характеристики потомства*

Множественно показано, что пренатальная физическая активность самок грызунов влияет на потомство: улучшает память (Parnpiansil et al.,

2003; Lee et al., 2006; Kim et al., 2007; Akhavan et al., 2008; Robinson, Bucci, 2014), усиливает нейрогенез в гиппокампе (Bick-Sander et al., 2006; Lee et al., 2006; Kim et al., 2007) и экспрессию BDNF (Parnpiansil et al., 2003; Aksu et al., 2012; Gomes da Silva et al., 2016), а также снижает тревожность (Aksu et al., 2012).

В одном из недавних исследований было еще раз подтверждено влияние бега в колесе у беременных самок мышей (C57BL/6J) на поведение, память и нейрогенез их потомства (Yau et al., 2019). Оказалось, что у потомства (F1), как женского, так и мужского пола было снижено депрессивно-подобное поведение (оценка производилась по тесту “вынужденное плавание”), в то же время только самцы продемонстрировали улучшение памяти. Так же у потомства мужского пола наблюдалось увеличение количества незрелых нейронов в вентральном гиппокампе, у самок — усиленная пролиферация клеток в дорсальной части гиппокампа. Примечательно, что дорсальная часть гиппокампа в большей степени связана с когнитивными функциями, тогда как вентральная — с эмоциональным состоянием (Anacker, Hen, 2017). Таким образом, результаты подтвердили, что активность беременных крыс влияет на поведение и нейрогенез потомства обоих полов, при указанном выше гендерном различии.

У мужского потомства самок мышей, страдающих ожирением, детектировалось снижение уровня BDNF, подавление нейрогенеза, пространственного обучения и памяти, а бег (6 раз в неделю в течение месяца) снижал эти отклонения (Tozuka et al., 2010; Kim et al., 2018).

В работе (Segabinazi et al., 2019) оценили влияние физической нагрузки у самок крыс до и во время беременности на обучение, память, уровень BDNF, рилина и метилирование ДНК в гиппокампе потомства (F1) мужского пола. Животные случайным образом были разделены на четыре группы: 1) самки, ведущие пассивный образ жизни до гестационного периода и во время 2) самки, бегающие на беговой дорожке до беременности 3) самки, бегающие только во время беременности и 4) физически активные самки до и во время беременности. Материнская двигательная нагрузка в группе “до беременности” и в группе “во время беременности” улучшала показатели обучаемости потомства. Однако изменений уровня BDNF в гиппокампе потомства разных групп обнаружено не было. Примечательно, что бег до беременности оказал наиболее сильное влияние на пространственную память потомства. Также бег до беременности существенно снижал метилирование ДНК в гиппокампе потомства, в отличие от других групп активных самок, где наблюдалась только тенденция к снижению. Более выраженное увеличение уровня рилина зафиксировано в группе

потомства от самок, бегающих до беременности, хотя и потомство физически активных самок в период беременности также показало существенное увеличение. Таким образом, самый значительный физиологический и когнитивный эффект физической нагрузки на потомство наблюдается в предшествующем беременности периоде. Напротив, потомство самок, которые бегали как до, так и во время беременности не отличалось от контрольных пассивных животных. Сами авторы объясняют подобный результат стрессом, который переживает самка, подвергаясь чрезмерной принудительной физической активности, что согласуется с другими работами (Wasinski et al., 2016; Jang et al., 2018).

На людях также показано улучшение когнитивных функций у потомства физически активных матерей (Wolfe et al., 1994; Clapp, 1996; Weissgerber et al., 2006). Например, у женщин (Clapp, 1996), которые вели активный образ жизни в течение всей беременности, дети (в возрасте пяти лет) лучше справились с тестом на интеллект (шкала Векслера) и показали лучшие устные языковые и математические навыки (Jukic et al., 2013; Esteban-Cornejo et al., 2016).

Таким образом, у млекопитающих уже достаточно убедительно показано, что интенсивная локомоция до и во время беременности может положительно влиять на когнитивные функции мозга и здоровье потомства (Davenport et al., 2018). Большинство исследователей делают акцент на молекулярных и клеточных изменениях, происходящих в гиппокампе и связанных с ними улучшениями памяти, обучения и эмоциональной сферы. В ряде исследований отмечен и высокий уровень BDNF и VEGF во фронтальной коре у потомства (Uysal et al., 2011; Aksu et al., 2012; Akhavan et al., 2013; Gomes da Silva et al., 2016). О возможных механизмах этих эффектов пока известно немного. Недавняя работа позволяет предполагать участие серотонина в материнских эффектах двигательной активности, по крайней мере у человека и некоторых позвоночных с выраженной складчатостью коры (Xing et al., 2020). В данной статье авторы успешно показали необходимость серотонина и его рецептора HTR2A для пролиферации базальных предшественников в субвентрикулярной зоне коры развивающегося эмбриона. Вполне вероятно, что экспрессия HTR2A у базальных предшественников нейронов, определяющая влияние серотонина на число предшественников и, как следствие, — число нейронов в коре головного мозга, может связывать двигательную активность матерей с лучшими когнитивными показателями потомков. Помимо рецепторных механизмов нельзя исключать и прямую модификацию внутриклеточным серотонином белковых мишеней в ооцитах по механизму серотонилирования: прямым присоединением серотонина к некото-

рых белкам лигандам, в частности гистонам (Vogonezhskaya, 2021).

Влияние двигательной активности самцов на поведение и когнитивные функции потомства

В последнее десятилетие появилось много свидетельств влияния отцовского образа жизни на фенотип потомства (Curley et al., 2011; Muchasiuk et al., 2012, 2013). У самцов мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жиров, появлялось потомство, страдающее ожирением, инсулинорезистентностью и нарушениями репродуктивной системы на два поколения вперед (Fullston et al., 2012, 2013, 2015). Физическая активность (плавание) в значительной мере нивелировала последствия ожирения, улучшая здоровье самцов (F0), что положительно сказывалось на здоровье потомства на разных этапах развития от эмбриона до взрослого организма (McPherson et al., 2013, 2015).

Также было показано, что может иметь место межгенерационная передача депрессивных и тревожных поведенческих фенотипов от самцов к поколению F1 (Dietz et al., 2011, 2012; Short et al., 2016). В недавнем исследовании сообщалось, что активное двигательное поведение самцов мышей снизило тревожный поведенческий фенотип потомства (Short et al., 2017). Мыши (C57BL/6) бегали в колесе на протяжении 4х недель по 50–60 км в неделю. Потомство бегающих самцов мужского пола (F1) показало достоверно меньшую тревожность в сравнении с контролем. Самки (F1) не показали различий ни по одному тесту. Также были идентифицированы три микроРНК (miR-19b, miR-455, miR-133a) и две транспортных РНК (тРНК-Gly и тРНК-Pro) в сперме самцов (F0), вероятно всего, оказавшие влияние на посттранскрипционную регуляцию генов, которые изменили траекторию развития мозга потомства (самцов F1) и связанного с ним аффективного поведения. Экспрессия 76 генов (9.0%) была повышена в сперме самцов, бегающих в колесе, в то время как 8 генов (0.9%) имели пониженную экспрессию. В целом, данные Short et al. (2017) свидетельствуют в пользу того, что анксиолитические эффекты могут передаваться потомству с учетом пола, при этом данная тема требует дальнейшего изучения.

В другом исследовании (Yin et al., 2013) авторы проверили влияние двигательной активности самцов (F0) на когнитивные функции потомства. Было показано, что бег повлиял на пространственное обучение и память потомства мужского пола. Также было продемонстрировано повышение содержания рилина и BDNF в гиппокампе. Увеличение содержания рилина и BDNF – белков, важных для развития мозга (Rice et al., 2001; Binder et al., 2004; Lakomá et al., 2011), процессов обучения и памяти (Kang et al., 1995; Herz et al., 2006;

Niu et al., 2008), подтвердили с помощью трех методов: ОТ-ПЦР, иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. Потомство мужского пола (самки проверены не были) показало большую исследовательскую активность и меньшую тревожность в тесте открытого поля. Также в тесте “водный лабиринт Морриса”, самцы (F1) продемонстрировали лучшую способность к пространственному обучению и памяти, чем потомки контрольной группы. В дополнение к этому, было показано, что у мужского потомства физически активных и содержащихся в обогащенной среде самцов крыс (самок не тренировали) снижено метилирование генома в гиппокампе и префронтальной коре (Mega et al., 2018).

В работе (Venito et al., 2018) подтвердился когнитивный межгенерационный эффект у самцов мышей, содержащихся в обогащенной среде (свободный доступ к беговому колесу + сенсорное разнообразие). Первоначально было установлено, что у самцов (F0), содержащихся в обогащенной среде, долговременная потенциация клеток зоны CA1 гиппокампа, оцениваемая по частоте возбуждающих постсинаптических потенциалов, выше, чем в контроле. Потомки (F1) обоих полов с рождения находились в стандартных лабораторных условиях и были проверены в возрасте трех месяцев. Оказалось, что у мышей (F1) от активных самцов долговременная потенциация в гиппокампе также выражена сильнее, чем у потомков самцов, содержащихся в стандартных условиях, что согласуется с результатами другой работы, проведенной на двухнедельных животных (Arai et al., 2009). При этом как в сперме, так и в гиппокампе активных мышей (F0) обнаружилось повышение уровня микроРНК, связанных с нейропластичностью и когнитивными функциями, в частности miR132 и miR212 (Remenyi et al., 2013; Hernandez-Rapp et al., 2015). С целью проверки участия “когнитивных микроРНК” в обеспечении межгенерационного влияния на гиппокампе их инъектировали в оплодотворенные яйцеклетки. Потомство, получившееся из ооцитов, инъектированных микроРНК активных самцов, продемонстрировало повышенный уровень долговременной потенциации, который был снижен до контрольного введением ингибиторов miR212 и miR132. Кроме того, мыши, развившиеся из ооцитов, в которые вводили микроРНК из сперматозоидов активных самцов, показали улучшение памяти по двум поведенческим тестам. Однако, несмотря на показанное воздействие miR-212 и miR-132 на долговременную потенциацию, по-видимому, эти виды РНК не оказывают определяющего влияния на поведенческие показатели, т.к. их ингибирование демонстрировало только незначительную тенденцию к снижению памяти. Наконец, уровень miR-212/132 не повышен у потомства активных самцов, что указывает на то, что механизмы, опосредующие усиле-

ние синаптической пластичности и памяти в поколении F0 и F1 могут отличаться и возможно по этой причине не происходит дальнейшей передачи эффектов к поколению F2.

Обширная работа McGreevy et al. (2019) также убедительно подтверждает передачу эффектов локомоторной активности от самцов грызунов к следующему поколению. Они включают в себя облегчение решения непространственных и пространственных когнитивных задач, нейрогенез и повышение активности митохондрий в гиппокампе. При этом никаких изменений в метилировании ДНК в половых клетках самцов F0 после бега обнаружено не было. Авторы предполагают, что возможный механизм эпигенетического наследования связан с деятельностью микроРНК. Ни в исследовании Venito et al., ни в данной работе модификации гистонов не проверялись.

Таким образом, на данный момент имеются подтверждения влияния двигательной активности на нейротрансмиттерный баланс, нейрогенез и структурно-функциональные связи в разных областях мозга млекопитающих, обеспечивающие длительные эффекты интенсивной локомоции. В нескольких работах обнаружено глобальное повышение ацетилирования гистонов в гиппокампе и префронтальной коре после интенсивной локомоции, что указывает на деконденсацию хроматина и может свидетельствовать о повышении пластичности генома в нервных клетках. Показаны и некоторые эпигенетические механизмы передачи эффектов интенсивной двигательной активности следующему поколению по материнской и по отцовской линиям, проявляющиеся в нейрофизиологических изменениях в ЦНС, когнитивном и эмоциональном поведении потомства (Yang et al., 2021). Большая часть данных, связанных с эпигенетическим наследованием в связи с интенсивной двигательной активностью получена из работы с грызунами, имеются немногочисленные исследования, проведенные с участием людей, при этом беспозвоночные в данном контексте не изучены вообще, что дает простор для дальнейших сравнительных исследований.

ПОИСКИ ЭВОЛЮЦИОННО-БИОЛОГИЧЕСКОГО СМЫСЛА ВЛИЯНИЯ ЛОКОМОЦИИ НА ФУНКЦИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время не хватает теоретической модели, объясняющей, почему двигательная активность приводит к длительному и передающемуся следующему поколению улучшению некоторых когнитивных функций, и почему такое влияние могло сформироваться в эволюции. Ответ на эти вопросы представляет не только фундаментальный интерес, он необходим для прогнозирования

терапевтических, а также возможных побочных эффектов двигательной нагрузки у человека.

Ряд антропологов (Raichlen, Alexander, 2017) придерживается мнения, что улучшение мозговых функций вследствие двигательной активности у современного человека возникло как адаптация предков людей в борьбе за добывание пищи. Поиск пропитания согласует в себе как моторную активность, так и когнитивную деятельность. Это сочетание аэробной активности с контролем двигательных систем, пространственной навигацией и памятью, принятием решений и планированием, а также контролем сенсорных систем и вниманием. Такая комбинация делает добывание пищи когнитивно-сложным поведением, которое может быть дополнительно усложнено изменением условий среды вследствие передвижения. Антрополог Дэниел Либерман убежден, что человеческое тело по своей биомеханике идеально приспособлено к умеренно интенсивной длительной физической нагрузке, такой как бег на длинные дистанции (Bramble, Lieberman, 2004; Lieberman 2012). Либерман предполагает, что бег на длинные дистанции может быть специфической эволюционной адаптацией к групповой охоте на большие расстояния, что также согласуется с предположениями других авторов. Таким образом, если взглянуть на выше-сказанные предположения с эволюционной перспективы, вывод может быть следующим: древние люди, у которых сильнее активировались когнитивные функции при двигательной нагрузке, подвергались положительному отбору, что и послужило укреплению связки “движение – познавательная деятельность” у потомков.

В.Е. Дьяконова сформулировала гипотезу о том, что эффекты двигательной активности имели место уже на ранних этапах эволюции животных, поэтому распространяются на различные таксономические группы и имеют консервативную нейрохимическую основу (Korshunova et al., 2016; Aonuma et al., 2020). Результаты экспериментов, проведенных на рыбах (Mes et al., 2020), моллюске (Korshunova et al., 2016; Aonuma et al., 2020), насекомых (Mezheritskiy et al., 2020), нематоде (Laranjeiro et al., 2017, 2019; Kumar et al., 2021) согласуются с данной гипотезой. Есть основания полагать, что в общей активации поведения, например, при увеличении скорости передвижения, задействован такой древний, распространенный в живой природе и важный для многих физиологических функций медиатор как серотонин (Aonuma et al., 2020). Очевидно, тема требует дальнейшего исследования и развития. Тем не менее, вышеприведенные публикации свидетельствуют в пользу гипотезы об общем нейрохимическом базисе эффектов двигательной активности.

Как уже было отмечено, мы предполагаем, что эпигенетические механизмы влияния двигатель-

ной активности на функции нервной системы сформировались в эволюции как упреждающая адаптация или преадаптация к возможному попаданию в новую среду. Понятие преадаптации рассматривается как обладание организмом определенными характеристиками, которые делают его более приспособленным к будущим изменениям окружающей среды. Эффекты предшествующей двигательной активности, благоприятствующие освоению в новой среде, обнаружены у далеких в систематическом отношении видов. Так, у мышей после интенсивной локомоции показана активация исследовательского поведения в условиях открытого поля (Yin et al., 2013), облегчение запоминания новой информации и забывания старой (Epp et al., 2016), у пресноводного моллюска выявлена способность лучше ориентироваться в новых условиях, угрожающих выживанию (Kogshunova et al., 2016; Aonuma et al., 2020), у сверчков — быстрее находить конспецификов в новой среде по звуковому сигналу (Mezheritsky et al., 2020) и побеждать их в ритуальных и физических состязаниях (Hofmann, Stevenson, 2000). Эти данные позволяют рассматривать интенсивную локомоцию как один из естественных способов повышения адаптивности поведения к возможным изменениям условий жизни у разных организмов.

Преадаптация к новизне прежде всего предполагает повышение пластичности поведения. В свою очередь повышение пластичности поведения в большой степени связано с пластичностью функционирования генома нервной системы (Espero-Gil et al., 2021). Полученные данные о характере эпигенетических перестроек вследствие моторной нагрузки как раз согласуются с этими ожиданиями. Результаты говорят о смещении баланса ацетилирования гистонов в сторону гиперацетилирования и смещении баланса метилирования ДНК в сторону деметилирования. Оба процесса сопряжены с повышением экспрессии генов. То, что подобные изменения выявлены у потомков первого поколения, но не следующих, также согласуется с гипотезой об активации биологических механизмов преадаптации к новым условиям, поскольку пребывание в привычных условиях должно уменьшать целесообразность их активации.

Каким образом, через какие механизмы интенсивная локомоция может повышать пластичность генома и влиять на изменчивость потомков? В настоящее время вопрос выбора удачных моделей и объектов для исследования приобретает ключевое значение для решения этой задачи. Идеальным объектом для изучения взаимодействия нейробиологических и репродуктивных механизмов в адаптациях, вызванных изменением условий обитания, было бы быстро и легко размножающееся животное, недорогое в содержании, с хорошо изученными функциями отдельных нейронов и генераторов поведения и доступное для ге-

нетического, транскрипционного и протеомного анализа происходящих изменений. Этим условиям удовлетворяют некоторые представители первичноротых организмов, на которых уже начаты исследования влияния физической нагрузки. Такие модельные объекты, как *C. elegance* и *D. melanogaster*, имеют преимущества в плане генетического анализа, оптогенетики. Брюхоногие моллюски удобны для изучения физиологии идентифицированных нейронов, их протеомики, транскриптомики и пластичности поведения на уровне полностью изолированных нервных клеток. Интересно, что среди многоклеточных деметилирование генома в ответ на резкие изменения среды в естественных условиях быстрой адаптации инвазивных видов впервые было показано именно на моллюсках (Huang 2017; Ardura 2018). Можно ожидать, что с беспозвоночными модельными объектами будут связаны существенные фундаментальные и практически-значимые открытия в этой области.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00318, частично поддержана ГЗ 0108-2019-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abel J.L.B., Rissman E.F. Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain // *International J. Developmental Neuroscience*. 2013. V. 31. № 6. P. 382–390.
- Akhavan M.M. et al. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups // *Neuroscience*. 2008. V. 151. № 4. P. 1173–1183.
- Akhavan M.M. et al. Maternal voluntary exercise during pregnancy enhances the spatial learning acquisition but not the retention of memory in rat pups via a TrkB-mediated mechanism: the role of hippocampal BDNF expression // *Iranian J. Basic Medical Sciences*. 2013. V. 16. № 9. P. 955.
- Aksu I. et al. Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life // *Neuroscience Letters*. 2012. V. 516. № 2. P. 221–225.
- Alarcón J.M. et al. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration // *Neuron*. 2004. V. 42. № 6. P. 947–959.

- Anacker C., Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility – linking memory and mood // *Nature Reviews Neuroscience*. 2017. V. 18. № 6. P. 335–346.
- Anderson B.J. et al. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze // *Physiology & Behavior*. 2000. V. 70. № 5. P. 425–429.
- Aonuma H., Mezheritskiy M., Boldyshev B. et al. The role of serotonin in the influence of intense locomotion on the behavior under uncertainty in the mollusk *Lymnaea stagnalis* // *Frontiers in Physiology*. 2020. V. 11. P. 221.
- Ardura A., Clusa L., Zaiko A. et al. Stress related epigenetic changes may explain opportunistic success in biological invasions in Antipode mussels // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 1–10.
- Baganz N., Horton R., Martin K. et al. Repeated swim impairs serotonin clearance via a corticosterone-sensitive mechanism: organic cation transporter 3, the smoking gun // *J. Neuroscience*. 2010. V. 30. № 45. P. 15185–15195.
- Bannister A.J., Kouzarides T. Reversing histone methylation // *Nature*. 2005. V. 436. № 7054. P. 1103–1106.
- Bao T.H., Miao W., Han J.H. et al. Spontaneous running wheel improves cognitive functions of mouse associated with miRNA expressional alteration in hippocampus following traumatic brain injury // *J. Molecular Neuroscience*. 2014. V. 54. № 4. P. 622–629.
- Barrett R.M., Wood M.A. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory // *Learning & Memory*. 2008. V. 15. № 7. P. 460–467.
- Basso J.C., Suzuki W.A. The effects of acute exercise on mood, cognition, neurophysiology, and neurochemical pathways: A review // *Brain Plasticity*. 2017. V. 2. № 2. P. 127–152.
- Beckett M.W., Ardern C.I., Rotondi M.A. A meta-analysis of prospective studies on the role of physical activity and the prevention of Alzheimer's disease in older adults // *BMC Geriatrics*. 2015. V. 15. № 1. P. 1–7.
- Bestor T.H. The DNA methyltransferases of mammals // *Human Molecular Genetics*. 2000. V. 9. № 16. P. 2395–2402.
- Bick-Sander A., Steiner B., Wolf S.A. et al. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. V. 103. № 10. P. 3852–3857.
- Binder D.K., Scharfman H.E. Brain-derived neurotrophic factor // *Growth Factors (Chur, Switzerland)*. 2004. V. 22. № 3. P. 123.
- Benito E., Kerimoglu C., Ramachandran B. et al. RNA-dependent intergenerational inheritance of enhanced synaptic plasticity after environmental enrichment // *Cell Reports*. 2018. V. 23. № 2. P. 546–554.
- Bousiges O., Vasconcelos A., Neidl R. et al. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus // *Neuropsychopharmacology*. 2010. V. 35. № 13. P. 2521–2537.
- Bramble D.M., Lieberman D.E. Endurance running and the evolution of *Homo* // *Nature*. 2004. V. 432. № 7015. P. 345–352.
- Chayer C., Freedman M. Frontal lobe functions // *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2001. V. 1. № 6. P. 547–552.
- Chieffi S., Messina G., Villano I. et al. Exercise influence on hippocampal function: possible involvement of orexin-A // *Frontiers in Physiology*. 2017. V. 8. P. 85.
- Clapp III J.F. Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy // *The J. Pediatrics*. 1996. V. 129. № 6. P. 856–863.
- Choi S.H., Bylykbashi E., Chatila et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model // *Science*. 2018. V. 361. № 6406. P. ean8821.
- Collins A., Hill L.E., Chandramohan Y. et al. Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 1. P. e4330.
- Cosín-Tomás M., Antonell A., Lladó A. et al. Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as early biomarkers of Alzheimer's disease: potential and limitations // *Molecular Neurobiology*. 2017. V. 54. № 7. P. 5550–5562.
- Curley J.P., Mashoodh R., Champagne F.A. Epigenetics and the origins of paternal effects // *Hormones and Behavior*. 2011. V. 59. № 3. P. 306–314.
- da Costa Daniele T.M., de Bruin P.F.C., de Matos R.S. et al. Exercise effects on brain and behavior in healthy mice, Alzheimer's disease and Parkinson's disease model – A systematic review and meta-analysis // *Behavioural Brain Research*. 2020. V. 383. P. 112488.
- Davenport M.H., Meah V.L., Ruchat S.M. et al. Impact of prenatal exercise on neonatal and childhood outcomes: a systematic review and meta-analysis // *British J. Sports Medicine*. 2018. V. 52. № 21. P. 1386–1396.
- Dietz D.M., Laplant Q., Watts E.L. et al. Paternal transmission of stress-induced pathologies // *Biological Psychiatry*. 2011. V. 70. № 5. P. 408–414.
- Dietz D.M., Nestler E.J. From father to offspring: paternal transmission of depressive-like behaviors // *Neuropsychopharmacology*. 2012. V. 37. № 1. P. 311.
- Donga J., Liua Y., Zhana Z. et al. MicroRNA-132 is associated with the cognition improvement following voluntary exercise in SAMP8 mice // *Brain Research Bulletin*. 2018. V. 140. P. 80–87.
- Dyakonova V.E. Origin and evolution of the nervous system: new data from comparative whole genome studies of multicellular animals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2022. V. 53. P. 55–64.
<https://doi.org/10.1134/S1062360422010088>
- Dyakonova T.L., Sultanakhmetov G.S., Mezheritskiy M.I. et al. Storage and erasure of behavioural experiences at the single neuron level // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. № 1. P. 1–14.
- Elsner V.R., Lovatel G.A., Bertoldi K. et al. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus // *Neuroscience*. 2011. V. 192. P. 580–587.
- Elsner V.R., Lovatel G.A., Moysés F. et al. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study // *Experimental Gerontology*. 2013. V. 48. № 2. P. 136–139.
- Elsner V.R., Basso C., Bertoldi K. et al. Differential effect of treadmill exercise on histone deacetylase activity in rat striatum at different stages of development // *The J. Physiological Sciences*. 2017. V. 67. № 3. P. 387–394.
- Epp J.R., Silva Mera R., Köhler, Epp J.R. et al. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference // *Nature Communications*. 2016. V. 7. № 1. P. 1–8.

- Espeso-Gil S., Holik A.Z., Bonnin S. et al.* Environmental enrichment induces epigenomic and genome organization changes relevant for cognition // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2021. P. 76.
- Esteban-Cornejo I., Martinez-Gomez D., Tejero-González C.M. et al.* Maternal physical activity before and during the prenatal period and the offspring's academic performance in youth. The UP&DOWN study // *The J. Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016. V. 29. № 9. P. 1414–1420.
- Fabel K., Fabel K., Tam B. et al.* VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // *European J. Neuroscience*. 2003. V. 18. № 10. P. 2803–2812.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S. et al.* Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3 // *Nature*. 2019. V. 567. № 7749. P. 535–539.
- Franjic D., Skarica M., Ma S. et al.* Transcriptomic taxonomy and neurogenic trajectories of adult human, macaque, and pig hippocampal and entorhinal cells // *Neuron*. 2021.
- Fullston T., Palmer N.O., Owens J.A. et al.* Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice // *Human Reproduction*. 2012. V. 27. № 5. P. 1391–1400.
- Fullston T., Ohlsson Teague E.M., Palmer N.O. et al.* Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content // *The FASEB J*. 2013. V. 27. № 10. P. 4226–4243.
- Fullston T., McPherson N.O., Owens J.A. et al.* Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet // *Physiological Reports*. 2015. V. 3. № 3. P. e12336.
- Goldberg A.D., Allis C.D., Bernstein E.* Epigenetics: a landscape takes shape // *Cell*. 2007. V. 128. № 4. P. 635–638.
- Gomes da Silva S., de Almeida A.A., Fernandes J. et al.* Maternal exercise during pregnancy increases BDNF levels and cell numbers in the hippocampal formation but not in the cerebral cortex of adult rat offspring // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 1. P. e0147200.
- Gomez-Pinilla F., Zhuang Y., Feng J. et al.* Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation // *European J. Neuroscience*. 2011. V. 33. № 3. P. 383–390.
- Grinkevich L.N., Vorobiova O.V.* Role of modulatory mediator serotonin in induction of epigenetic processes during long-term memory formation in *Helix* // *Russian J. Genetics: Applied Research*. 2014. V. 4. № 6. P. 526–532.
- Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S. et al.* Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure // *Cell*. 2002. V. 111. № 4. P. 483–493.
- Gupta S., Kim S.Y., Artis S. et al.* Histone methylation regulates memory formation // *J. Neuroscience*. 2010. V. 30. № 10. P. 3589–3599.
- Hart A.K., Fioravante D., Liu R.Y. et al.* Serotonin-mediated synapsin expression is necessary for long-term facilitation of the *Aplysia* sensorimotor synapse // *J. Neuroscience*. 2011. V. 31. № 50. P. 18401–18411.
- He L., Hannon G.J.* MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation // *Nature Reviews Genetics*. 2004. V. 5. № 7. P. 522–531.
- Heijnen S., Hommel B., Kibele et al.* Neuromodulation of aerobic exercise – a review // *Frontiers in Psychology*. 2016. V. 6. P. 1890.
- Hernandez-Rapp J., Smith P.Y., Filali M. et al.* Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice // *Behavioural Brain Research*. 2015. V. 287. P. 15–26.
- Herz J., Chen Y.* Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity // *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. V. 7. № 11. P. 850–859.
- Hofmann H.A., Stevenson P.A.* Flight restores fight in crickets // *Nature*. 2000. V. 403. № 6770. P. 613.
- Hu T., Zhou F.J., Chang Y.F. et al.* miR21 is associated with the cognitive improvement following voluntary running wheel exercise in TBI mice // *J. Molecular Neuroscience*. 2015. V. 57. № 1. P. 114–122.
- Huang X., Li S., Ni P. et al.* Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives // *Molecular Ecology*. 2017. V. 26. № 23. P. 6621–6633.
- Ieraci A., Mallei A., Musazzi L. et al.* Physical exercise and acute restraint stress differentially modulate hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts and epigenetic mechanisms in mice // *Hippocampus*. 2015. V. 25. № 11. P. 1380–1392.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A. et al.* Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // *ACS Chemical Neuroscience*. 2019. V. 10. № 8. P. 3888–3899.
- Jaenisch R., Bird A.* Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // *Nature Genetics*. 2003. V. 33. № 3. P. 245–254.
- Jang Y., Lee B., Kim E.K. et al.* Involuntary swimming exercise in pregnant rats disturbs ERK1/2 signaling in embryonic neurons through increased cortisol in the amniotic fluid // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018. V. 495. № 1. P. 1208–1213.
- Jian C., Mengru Lu, Zhao Zhang et al.* miR-34a knockout attenuates cognitive deficits in APP/PS1 mice through inhibition of the amyloidogenic processing of APP // *Life Sciences*. 2017. V. 182. P. 104–111.
- Jones P.A., Takai D.* The role of DNA methylation in mammalian epigenetics // *Science*. 2001. V. 293. № 5532. P. 1068–1070.
- Jukic A.M., Lawlor D.A., Juhl M. et al.* Physical activity during pregnancy and language development in the offspring // *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2013. V. 27. № 3. P. 283–293.
- Kang H., Schuman E.M.* Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus // *Science*. 1995. V. 267. № 5204. P. 1658–1662.
- Kim T.W., Park H.S.* Physical exercise improves cognitive function by enhancing hippocampal neurogenesis and inhibiting apoptosis in male offspring born to obese mother // *Behavioural Brain Research*. 2018. V. 347. P. 360–367.
- Kim H., Lee S.H., Kim S.S. et al.* The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups // *In-*

- ternational J. Developmental Neuroscience. 2007. V. 25. № 4. P. 243–249.
- Klempin F., Beis D., Mosienko V. et al. Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // J. Neuroscience. 2013. V. 33. № 19. P. 8270–8275.
- Kondo M., Shimada S. Serotonin and exercise-induced brain plasticity // Neurotransmitter. 2015. V. 2.
- Konopka W., Kiryk A., Novak M. et al. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice // J. Neuroscience. 2010. V. 30. № 44. P. 14835–14842.
- Korshunova T.A., Vorontsov D.D., Dyakonova V.E. Previous motor activity affects the transition from uncertainty to decision making in snails // J. Experimental Biology. 2016. V. 219. № 22. P. 3635–3641.
- Kriaucionis S., Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain // Science. 2009. V. 324. № 5929. P. 929–930.
- Kumar S., Behera S., Basu A. et al. Swimming exercise promotes post-injury axon regeneration and functional restoration through AMPK // Eneuro. 2021. V. 8. № 3.
- Lacal I., Ventura R. Epigenetic inheritance: concepts, mechanisms and perspectives // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2018. V. 11. P. 292.
- Lakomá J., Garcia-Alonso L., Luque J.M. Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis // Development. 2011. V. 138. № 23. P. 5223–5234.
- Laranjeiro R., Harinath G., Burke D. et al. Single swim sessions in *C. elegans* induce key features of mammalian exercise // BMC Biology. 2017. V. 15. № 1. P. 1–17.
- Laranjeiro R., Harinath G., Hewitt J.E. et al. Swim exercise in *Caenorhabditis elegans* extends neuromuscular and gut healthspan, enhances learning ability, and protects against neurodegeneration // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019. V. 116. № 47. P. 23829–23839.
- Laurence N.C., Labuschagne L.G., Lura B.G. et al. Regular exercise enhances task-based industriousness in laboratory rats // PLoS One. 2015. V. 10. № 6. P. e0129831.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // Cell. 1993. V. 75. № 5. P. 843–854.
- Lee H.H., Kim H., Lee J.W. et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups // Brain and Development. 2006. V. 28. № 3. P. 147–154.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms in memory formation // Nature Reviews Neuroscience. 2005. V. 6. № 2. P. 108–118.
- Lieberman D.E. Those feet in ancient times // Nature. 2012. V. 483. № 7391. P. 550–551.
- Lin T.W., Kuo Y.M. Exercise benefits brain function: the monoamine connection // Brain Sciences. 2013. V. 3. № 1. P. 39–53.
- Liu N., Landreh M., Cao K. et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila* // Nature. 2012. V. 482. № 7386. P. 519–523.
- Lovatel G., Elsner V., Bertoldi K. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus // Neurobiology of Learning and Memory. 2013. V. 101. P. 94–102.
- McGreevy K.R., Tezanos P., Ferreira-Villar I. et al. Intergenerational transmission of the positive effects of physical exercise on brain and cognition // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019. V. 116. № 20. P. 10103–10112.
- McPherson N.O., Bakos H.W., Owens J.A. et al. Improving metabolic health in obese male mice via diet and exercise restores embryo development and fetal growth // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. P. e71459.
- McPherson N.O., Owens J.A., Fullston T. et al. Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring // American J. Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2015. V. 308. № 9. P. E805–E821.
- Mega F., de Meireles A.L.F., Piazza F.V. et al. Paternal physical exercise demethylates the hippocampal DNA of male pups without modifying the cognitive and physical development // Behavioural Brain Research. 2018. V. 348. P. 1–8.
- Merkley C.M., Jian C., Mosa A. et al. Homeostatic regulation of adult hippocampal neurogenesis in aging rats: long-term effects of early exercise // Frontiers in Neuroscience. 2014. V. 8. P. 174.
- Mes D., Palstra A.P., Henkel C.V. et al. Swimming exercise enhances brain plasticity in fish // Royal Society Open Science. 2020. V. 7. № 1. P. 191640.
- Middleton L.E., Barnes D.E., Lui L.Y. et al. Physical activity over the life course and its association with cognitive performance and impairment in old age // J. American Geriatrics Society. 2010. V. 58. № 7. P. 1322–1326.
- Mezheritskiy M., Vorontsov D., Lapshin D. et al. Previous flight facilitates partner finding in female crickets // Scientific Reports. 2020. V. 10. № 1. P. 1–10.
- Moroz L.L., Nikitin M.A., Poličar P.G. et al. Evolution of glutamatergic signaling and synapses // Neuropharmacology. 2021. V. 199. P. 108740.
- Mychasiuk R., Zahir S., Schmolz N. et al. Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome // Behavioural Brain Research. 2012. V. 228. № 2. P. 294–298.
- Mychasiuk R., Harker A., Ilnytskyy S. et al. Paternal stress prior to conception alters DNA methylation and behaviour of developing rat offspring // Neuroscience. 2013. V. 241. P. 100–105.
- Niu S., Yabut O., D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons // J. Neuroscience. 2008. V. 28. № 41. P. 10339–10348.
- Parnpiansil P., Jutapakdeegul N., Chentanez T. et al. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup // Neuroscience Letters. 2003. V. 352. № 1. P. 45–48.
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA // Nature. 2000. V. 408. № 6808. P. 86–89.
- Perez M.F., Lehner B. Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals // Nature Cell Biology. 2019. V. 21. № 2. P. 143–151.
- Pietrelli A., Matković L., Vacotto M., Lopez-Costa J. et al. Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats // Neurobiology of Learning and Memory. 2018. V. 155. P. 528–542.
- Pons-Espinal M., Caterina Gasperini, Matteo J. Marzi et al. MiR-135a-5p is critical for exercise-induced adult neu-

- rogenesis // *Stem Cell Reports*. 2019. V. 12. № 6. P. 1298–1312.
- Raichlen D.A., Alexander G.E. Adaptive capacity: an evolutionary neuroscience model linking exercise, cognition, and brain health // *Trends in Neurosciences*. 2017. V. 40. № 7. P. 408–421.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 2000. V. 403. № 6772. P. 901–906.
- Remenyi J., van den Bosch M.W., Palygin O. et al. miR-132/212 knockout mice reveal roles for these miRNAs in regulating cortical synaptic transmission and plasticity // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. e62509.
- Reolon G.K., Maurmann N., Werenicz A. et al. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats // *Behavioural Brain Research*. 2011. V. 221. № 1. P. 329–332.
- Rhee I., Jair K.W., Yen R.W. et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1 // *Nature*. 2000. V. 404. № 6781. P. 1003–1007.
- Rice D.S., Curran T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development // *Annual Review of Neuroscience*. 2001. V. 24. № 1. P. 1005–1039.
- Robinson A.M., Bucci D.J. Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring // *Neuroscience*. 2014. V. 256. P. 53–60.
- Saab B.J., Mansuy I.M. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: the role of microRNAs // *Neuropharmacology*. 2014. V. 80. P. 61–69.
- Saha R.N., Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis // *Cell Death & Differentiation*. 2006. V. 13. № 4. P. 539–550.
- Sant' Anna G., Elsner V.R., Moysés F. et al. Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats // *Neuroscience Letters*. 2013. V. 556. P. 152–154.
- Sarkar S., Engler-Chiurazzi E.B., Cavendish J.Z. et al. Overexpression of miR-34a induces rapid cognitive impairment and Alzheimer's disease-like pathology // *Brain Research*. 2019. V. 1721. P. 146327.
- Segabinazi E., Spindler C., Meireles A.L.F. et al. Effects of maternal physical exercise on global DNA methylation and hippocampal plasticity of rat male offspring // *Neuroscience*. 2019. V. 418. P. 218–230.
- Shevtsova O., Tan Y.F., Merkle C.M. et al. Early-age running enhances activity of adult-born dentate granule neurons following learning in rats // *Eneuro*. 2017. V. 4. № 4.
- Short A.K., Fennell K.A., Perreau V.M. et al. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small noncoding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring // *Translational Psychiatry*. 2016. V. 6. № 6. P. e837.
- Short A., Yeshurun S., Powell R. et al. Exercise alters mouse sperm small noncoding RNAs and induces a transgenerational modification of male offspring conditioned fear and anxiety // *Translational Psychiatry*. 2017. V. 7. № 5. P. e1114.
- Sølvsten C.A., de Paoli F., Christensen J.H. et al. Voluntary physical exercise induces expression and epigenetic remodeling of VegfA in the rat hippocampus // *Molecular Neurobiology*. 2018. V. 55. № 1. P. 567–582.
- Spindler C., Cechinel L.R., Basso C. et al. Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylase activities in frontal cortices from wistar rats // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2014. V. 34. № 8. P. 1097–1101.
- Sultan F.A., Sweatt J.D. The role of the Gadd45 family in the nervous system: a focus on neurodevelopment, neuronal injury, and cognitive neuroepigenetics // *Gadd45 Stress Sensor Genes*. 2013. P. 81–119.
- Tozuka Y., Kumon M., Wada E. et al. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring // *Neurochemistry International*. 2010. V. 57. № 3. P. 235–247.
- Trejo J.L., Carro E., Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus // *J. Neuroscience*. 2001. V. 21. № 5. P. 1628–1634.
- Uysal N., Sisman A.R., Dayi A. et al. Maternal exercise decreases maternal deprivation induced anxiety of pups and correlates to increased prefrontal cortex BDNF and VEGF // *Neuroscience Letters*. 2011. V. 505. № 3. P. 273–278.
- Valenzuela P.L., Castillo-García A., Morales J.S. et al. Exercise benefits on Alzheimer's disease: State-of-the-science // *Ageing Research Reviews*. 2020. V. 62. P. 101108.
- van Praag H., Christie B.R., Sejnowski T.J. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999a. V. 96. № 23. P. 13427–13431.
- van Praag H., Kempermann G., Gage F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus // *Nature Neuroscience*. 1999b. V. 2. № 3. P. 266–270.
- Van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions // *Neuromolecular Medicine*. 2008. V. 10. № 2. P. 128–140.
- Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1931–1934.
- Varma V.R., Tang X., Carlson M.C. Hippocampal sub-regional shape and physical activity in older adults // *Hippocampus*. 2016. V. 26. № 8. P. 1051–1060.
- Vertino P.M., Yen R.W., Gao J. et al. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase // *Molecular and Cellular Biology*. 1996. V. 16. № 8. P. 4555–4565.
- Voronezhskaya E.E. Maternal serotonin: Shaping developmental patterns and behavioral strategy on progeny in molluscs // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2021. P. 578.
- Wang W., Kwon E.J., Tsai L.H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases // *Learning & Memory*. 2012. V. 19. № 9. P. 359–368.
- Wasinski F., Estrela G.R., Arakaki A.M. et al. Maternal forced swimming reduces cell proliferation in the postnatal dentate gyrus of mouse offspring // *Frontiers in Neuroscience*. 2016. V. 10. P. 402.
- Watkins B.A. Endocannabinoids, exercise, pain, and a path to health with aging // *Molecular Aspects of Medicine*. 2018. V. 64. P. 68–78.
- Weissgerber T.L., Wolfe L.A., Davies G.A. et al. Exercise in the prevention and treatment of maternal–fetal disease: a review of the literature // *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2006. V. 31. № 6. P. 661–674.

- Wolfe L.A., Brenner I.K.M., Mottola M.F.* Maternal exercise, fetal well-being and pregnancy outcome // *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 1994. V. 22. № 1. P. 145–194.
- Xing L., Kalebic N., Namba T. et al.* Serotonin receptor 2A activation promotes evolutionarily relevant basal progenitor proliferation in the developing neocortex // *Neuron*. 2020. V. 108. № 6. P. 1113–1129. e6.
- Xua Y., Chen P., Wang X. et al.* miR-34a deficiency in APP/PS1 mice promotes cognitive function by increasing synaptic plasticity via AMPA and NMDA receptors // *Neuroscience Letters*. 2018. V. 670. P. 94–104.
- Yang Y., Lagisz M., Foo Y.Z. et al.* Beneficial intergenerational effects of exercise on brain and cognition: a multilevel meta-analysis of mean and variance // *Biological Reviews*. 2021. V. 96. № 4. P. 1504–1527.
- Yau Suk-Yu, Lee Thomas Ho-Yin, Formolo Douglas Affonso et al.* Effects of maternal voluntary wheel running during pregnancy on adult hippocampal neurogenesis, temporal order memory, and depression-like behavior in adult female and male offspring // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. V. 13. P. 470.
- Yin M.M., Wang W., Sun J. et al.* Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring // *Behavioural Brain Research*. 2013. V. 253. P. 297–304.
- Zhong T., Ren F., Huang C.S. et al.* Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice // *Neuroscience*. 2016. V. 316. P. 378–388.
- Zohar O., Schreiber S., Getslev V. et al.* Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice // *Neuroscience*. 2003. V. 118. № 4. P. 949–955.

Long-Term and Inherited Behavioral Changes Induced by Intense Locomotion: Epigenetic Mechanisms and Possible Adaptive Implications

M. I. Mezheritskiy^{1,*} and V. E. Dyakonova^{1,**}

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

**e-mail: labor405@gmail.com*

***e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

The review is devoted to the analysis of long-term and transmitted to the next generation effects of intense locomotion on the cognitive functions of animals and humans. To date, the anxiolytic and cognitive-enhancing long-term effects of intense locomotion have been demonstrated in humans, rodents, fish, insects, molluscs and nematodes. In rodents, the influence intense locomotion are passed to the offspring of the first generation. These include reduced anxiety, improved spatial learning and memory, and increased levels of brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor in the hippocampus and frontal cortex. The shift in the balance of histone acetylation in the hippocampus of rodents towards hyperacetylation, and the balance of DNA methylation towards demethylation manifests itself both as a direct effect and as an inherited effect of motor activity by the first generation. Mechanisms linking locomotion with increased plasticity of the brain genome of offspring remain poorly understood. We argue that invertebrate model organisms would be ideal objects for its study. Currently, there is a lack of a theoretical model explaining why physical activity leads to a long-term and transferable to the next generation improvement in some cognitive functions, and why such an influence could form in evolution. The answer to these questions is not only of scientific interest, it is necessary to predict therapeutic, as well as possible side effects of intense physical activity in humans. In this regard, the article pays special attention to the review of ideas related to the evolutionary aspects of the problem. We propose our own hypothesis, according to which the activating effect of intense locomotion on the functioning of the nervous system could have been formed in evolution as a pre-adaptation to a possible entry into a new environment.

Keywords: exercise, physical activity, locomotion, memory, learning, neurogenesis, epigenetics

УДК 577.21

СЕМЕЙСТВО КАНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ С ТРАНЗИТОРНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ – TRP

© 2022 г. Е. Е. Куваева^а, И. Б. Мерцалов^а, О. Б. Симонова^а, *^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 01.07.2022 г.

Белки с транзиторным рецепторным потенциалом (Transient Receptor Potential – TRP) функционируют в клеточной мембране как проницаемые для Ca^{2+} неселективные катионные каналы. Они играют критическую роль в работе сенсорных систем: зрительной, вкусовой, обонятельной, слуховой, осязательной, термо- и осморегуляторной. Некоторые члены семейства TRP, как оказалось, могут играть важную роль в контроле роста, дифференцировки, пролиферации, поляризации клеток и апоптозе. Каналы TRP демонстрируют более разнообразные механизмы активации и селективности, чем любая другая группа ионных каналов – один канал TRP может быть активирован различными механизмами. Тем не менее, общим для белков семейства TRP является то, что они не только играют решающую роль в восприятии всех основных классов внешних раздражителей, но также способны определять локальные изменения внутренней среды организма. Взрыв интереса к каналам TRP за последние два десятилетия привел к радикальной реструктуризации семейства. Обзор посвящен описанию канальных белков-рецепторов семейства TRP, истории их изучения и классификации.

Ключевые слова: сенсорные системы, рецептор, ионные каналы, TRP

DOI: 10.31857/S0475145022050044

ВВЕДЕНИЕ

Чтобы выжить, организмы приспособились к быстрому и точному восприятию окружающей среды. Одна группа биомолекул, которые играют ключевую роль в трансформации этих стимулов в импульсы, регистрируемые нервной системой, представляет собой класс трансмембранных белков с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP). Каналы TRP – это полимодальные клеточные сенсоры, участвующие в широком спектре процессов, главным образом путем изменения мембранного потенциала и увеличения концентрации Ca^{2+} в клетке, а некоторые каналы проницаемы для сильно гидратированных ионов Mg^{2+} . Многие из этих каналов участвуют в различных путях передачи сенсорной информации (термочувствительности, механочувствительности, вкусовой передаче, болевой чувствительности, восприятию жгучих соединений, феромонов) и регуляции осмolarity (Montell, 2001; Minke, Cook, 2002; Clapham, 2003; Julius, 2005; Nilius, Mahieu, 2006; Nishida et al., 2006). Считается, что в организме некоторые каналы TRP ведут себя как микроскопические термометры и используются для определения тепла или холода. Другие каналы TRP ак-

тивируются молекулами, содержащимися в таких специях, как чеснок (аллицин), перец чили (капсаицин), васаби (аллилизотиоцианат); или активируются ментолом, камфорой, мятой и охлаждающими агентами; третьи активируются молекулами, содержащимися в каннабисе (например, тетрагидроканнабинол, каннабидиол и каннабинол) или стевии. Некоторые действуют как датчики осмотического давления, объема, растяжения и вибрации. Помимо сенсорного восприятия, каналы TRP участвуют во многих других процессах, включая секрецию слюнной жидкости, воспаление, регуляцию сердечно-сосудистой системы, тонуса гладких мышц, давления, гомеостаза Ca^{2+} и Mg^{2+} и лизосомной функции (Montell, 2001; Minke, Cook, 2002; Clapham, 2003; Nilius, Voets, 2005). Кроме того, показано, что каналы TRP участвуют в клеточной адгезии, контроле роста и дифференцировки, пролиферации, поляризации клеток и апоптозе (Miller, 2006; Nishida et al., 2006; Abramowitz, Birnbaumer, 2009; Dadon, Minke, 2010). Известно, что каналы TRP играют важную регуляторную роль в функционировании клеточных органелл (таких как эндосомы и лизосомы).

Впервые канал TRP был обнаружен у мутантных мушек *Drosophila melanogaster*, фоторецепто-

ры которых были неспособны поддерживать потенциал в ответ на продолжительное световое возбуждение (Cosens, Manning, 1969; Hardie, Minke, 1992). На данный момент обнаружено более 50 TRP каналов у различных видов живых организмов, что составляет порядка 20% всех известных генов, кодирующих ионные каналы. Наиболее древние каналы TRP, которые обнаружены у простейших и грибов, включая дрожжи, отвечали за хемо-, термо- и механочувствительность. Многие из этих функций сохранились за ними у различных организмов от простейших до человека. Всего у млекопитающих обнаружено 28 каналов TRP.

Мутации в генах *TRP* могут приводить к патологическим состояниям, включая нейродегенеративные расстройства, дисплазию скелета, рак, заболевания сердца и почек. Текущие исследования могут помочь найти новые методы лечения этих заболеваний, поскольку каналы TRP рассматриваются как важные терапевтические мишени.

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фототрансдукция

В 1969 г. Косенс и Мэннинг идентифицировали особые поведенческие мутанты дрозофилы: мухи проявляли нормальный положительный фототаксис в Т-образном лабиринте при слабом внешнем освещении, но при постоянном воздействии яркого света они переставали реагировать — демонстрировали слепоту (Cosens, Manning, 1969). У мутантов была нарушена функция сетчатки — важного отдела зрительного анализатора, обеспечивающего восприятие и преобразование электромагнитного излучения видимой части спектра в нервные импульсы и их первичную обработку. Тем не менее, электроретинограмма (ЭРГ), которая представляет собой суммарную электрическую реакцию всего глаза на свет, регистрировалась в сложном глазу “слепого” мутанта дрозофилы восстановление реакции на свет, но отсроченное по времени — 30–40 с, тогда как у мух дикого типа полное восстановление происходит за 10 с. Замедленное восстановление зрения у мутантов и специфика кривой ЭРГ позволили предположить, что в светочувствительных рецепторных клетках сетчатки мутантного глаза происходит недостаточно быстрая регенерация зрительного пигмента. В итоге наступает временная псевдослепота (Cosens, Manning, 1969). Было показано, что нормальное функционирование продукта гена *trp* на стадии куколки дрозофилы важно для развития зрительных органов и фототрансдукции у имаго (Montell, Rubin, 1989; Wong et al., 1989). В 1992 г. Минке предоставил доказательства того, что рецептор TRP — это ионный канал, открывающийся в ответ на световую стимуляцию (Hardie, Minke, 1992).

Тогда же, в 1992 г., у дрозофилы в тканях глазного поля был идентифицирован TRP-подобный канал (TRPL). Ген, кодирующий этот белок, был клонирован и охарактеризован исследовательской группой Леонарда Келли (Phillips et al., 1992). Таким образом, первыми открытыми каналами семейства TRP были каналы TRP и TRPL дрозофилы, которые играют ключевую роль в фототрансдукции (Hardie, Raghu, 2001; Katz, Minke, 2009).

Эти основополагающие открытия вызвали взрыв интереса к каналам TRP. Оказалось, что они также играют важную роль в передаче болевых ощущений и могут контролировать термо- и механочувствительность.

Ноцицепция и термочувствительность

Ноцицептор — это первичный афферентный (сенсорный) нейрон, который активируется только болевым раздражителем. Ноцицепторы имеют множество сенсорных рецепторов, распознающих различные изменения внешней (химические раздражители, температура и т.д.) и внутренней (изменение состава межклеточного вещества, выброс клетками сигнальных молекул и т.д.) среды. Действие химических веществ, температуры, а также медиаторов воспаления поврежденных тканей приводит к их активации. Также ноцицепторы участвуют в создании болевых синдромов при патологических состояниях, вызванных повреждением нервов или опухолью. Каждый нейрон содержит разный набор рецепторов, воспринимающих специфический вид раздражителя. В зависимости от активации того или иного набора рецепторов центральная нервная система реагирует на болевые ощущения и запускает механизм, направленный на мобилизацию защитных процессов, восстановление поврежденной ткани и нормальной жизнедеятельности организма. Более глубокое понимание ноцицепции представляет большой интерес, и модельные организмы могут помочь в изучении этого процесса соматосенсорной системы.

Первое беспозвоночное животное, у которого была идентифицирована ноцицептивная клетка — медицинская пиявка *Hirudo medicinalis*, каждый сегмент тела которой имеет ганглий и содержит осязательные (T), чувствительные к давлению (P) и чувствительные к боли (N) клетки (Nicholls, Baylor, 1968). Более поздние исследования реакции нейронов пиявок на механическую, химическую и тепловую стимуляцию привели к выводу о существовании аналогичной функции полимодальных ноцицепторов у млекопитающих (Pastor et al., 1996).

Дрозофила широко используется в исследованиях ноцицепции и боли у беспозвоночных. Было показано, что плодовые мушки способны к “обу-

чению через боль” (Quinn et al., 1974). Если сочетать предъявление запаха с ударом электрического тока, то у мух вырабатывается длительная негативная реакция на запах, даже если подача тока прекращена. В обратной последовательности событий, когда электрический удар следовал перед подачей запаха, мухи двигались в сторону запаха, так как он ассоциировался у них с прекращением боли. Та же реакция характерна для личинок дрозофилы (Aceves-Pina, Quinn, 1979).

Нагретый шуп (42°C) вызывает у личинок *Drosophila melanogaster* сложное поведение избегания — перекатывание вокруг своей оси, которое происходит всего за 0.4 секунды; обычный шуп не вызывает такого поведения (Tracey et al., 2003). Напротив, холодовые стимулы ($\leq 14^\circ\text{C}$) в первую очередь вызывают двустороннее сокращение всего тела вдоль оси “голова-хвост”; личинки также могут реагировать, поднимая голову и/или хвост, но эти реакции возникают реже при снижении температуры. Они реагируют на кислоты (Lopez-Bellido et al., 2019) и ментол (Himmel et al., 2019) той же стереотипной реакцией перекатывания (Walters, Williams, 2019). Электроакцепторный аллилизотиоцианат (АИТС) вызывает ноцицептивную сенсibilизацию у личинок. У взрослых мух такие вещества как: ментол (Abed-Vieillard et al., 2014), АИТС (Kang et al., 2010), капсаицин (алкалоид, содержащийся в различных видах стручкового перца чили) (Li et al., 2020) и ряд других химических веществ вызывают отвращение, которое детектируется отсутствием рефлекса вытягивания хоботка и влияет на предпочтение мест для откладывания яиц.

Ген дрозофилы *painless* (*pain*) кодирует неселективный катионный канал семейства TRPA, который необходим для восприятия губительных тепловых и механических раздражителей. Он был обнаружен в 2003 г. в результате идентификации мутанта дрозофилы, который не воспринимал повреждающие механические и тепловые воздействия (Tracey et al., 2003). Ген *painless* экспрессируется в мультидендритных и хордотональных сенсорных нейронах и необходим для активации сенсорных нейронов высокой температурой (Tracey et al., 2003).

Еще в середине XX в. обнаружили, что большие дозы капсаицина вызывают у экспериментальных животных новый тип обезболивания (анальгезии) (Palermo et al., 1981). Животные, после введения им капсаицина, теряли чувствительность к различным внешним раздражителям, а также у них не развивалось нейрогенное воспаление. Рецептор, реагирующий на капсаицин и изменения температуры, был охарактеризован Дэвидом Джулиусом и его коллегами на молекулярном уровне и назван TRPV1 (Transient Receptor Potential Channel Vanilloid Family Member 1 — первый

представитель ванилоидного семейства каналов с транзиторным рецепторным потенциалом) (Caterina et al., 1997). Независимо друг от друга Дэвид Джулиус и Ардем Патапутян показали, что другой рецептор TRPM8, реагирующий на ментол, с таким же успехом активируется холодом (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a, 2002b). Эти и другие прорывные открытия положили начало интенсивному исследованию механизмов восприятия тепла, холода и механических раздражителей. За свои открытия Джулиус и Патапутян получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 2021 г.

Благодаря идентификации ванилоидного рецептора TRPV1 и клонированию его гена был достигнут большой прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе передачи болевых сигналов ионными каналами TRP, которые функционируют в ноцицептивных путях на этапе преобразования внешнего раздражителя в электрический импульс (Caterina et al., 1997). В ооцитах *Xenopus* и клетках мезонефроса человека (НЕК) TRPV1-зависимые импульсы блокируются стимулами, которые способны активировать ноцицепторы, включая нагревание в пагубном для организма диапазоне температур, воздействие протонами и капсаицин (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Канал TRPV1 закрывается при нагревании в диапазоне 42–48°C, а родственный канал, TRPV2, активируется при еще более высоких температурах (Caterina et al., 1999). Тем не менее, несмотря на то, что канал TRPV1 позвоночных в одних системах активируется теплом, а в других протонами, мутантные по *TRPV1* мыши все же демонстрируют заметную поведенческую реакцию избегания в ответ на повышение температуры и испытывают механическую ноцицепцию, что предполагает существование дополнительных генов, вовлеченных в эти процессы (Caterina et al., 2000).

Механочувствительность

Механосенсорная трансдукция лежит в основе широкого спектра восприятий, включая проприоцепцию, осязание, чувство равновесия и слух. Центральным элементом этих органов чувств является механически управляемый ионный канал, который преобразует звук, давление или движение в изменения возбудимости специализированных сенсорных клеток.

Дрозофила является привлекательной моделью для анализа механосенсорики, благодаря возможности комбинировать генетические манипуляции и измерения электрофизиологических характеристик отдельных механорецепторных нейронов (Kernan et al., 1994). Механосенсорный спектр восприятий мухи включает осязание, проприоцепцию и слух,

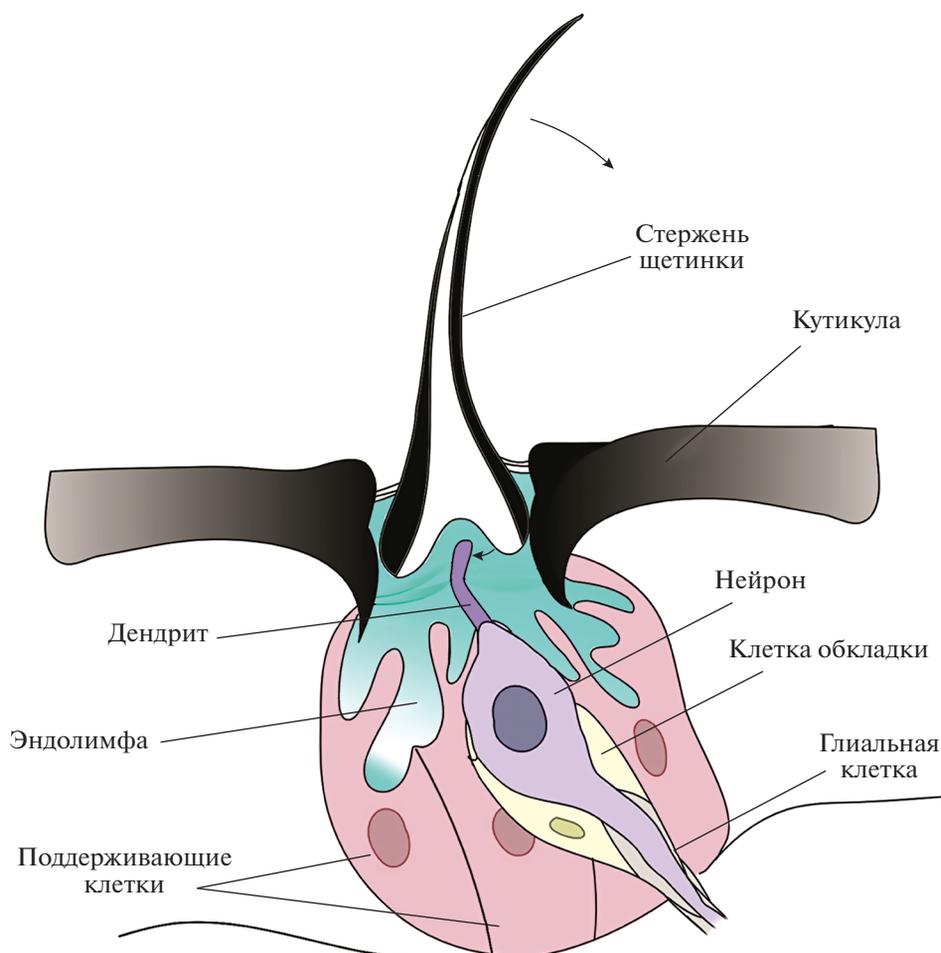


Рис. 1. Схема механорецептора дрозофилы, состоящего из пологого стержня щетинки и трех типов клеток: поддерживающих, клеток обкладки и реснитчатого механосенсорного нейрона. Дендрит находится в эндолимфе с высокой концентрацией K^+ , что обеспечивает высокое (~ 120 мВ) напряжение возбуждения в нейроне. Смещение стержня (обозначено стрелками) сжимает кончик дендрита и открывает трансдукционные каналы.

опосредованные сенсорными щетинками, сенсиллами, хордотональными органами и механорецепторами типа II (Kernan, Zuker, 1995). Среди них именно сенсорные щетинки особенно хорошо поддаются физиологическим манипуляциям у интактных животных. Каждый механосенсорный щетинковый орган состоит из пологого волосяного стержня, основание которого упирается в дендритный кончик биполярного сенсорного нейрона. Таким образом, стержень действует как крошечное плечо рычага: отклонения щетинки сжимают кончик дендрита нейрона и открывают трансдукционные каналы (Thurm, 1965). Механосенсорный зубец омывается жидкостью с высокой концентрацией K^+ и низким содержанием Ca^{2+} (Corfas, Dudai, 1990), которая обеспечивает мощный потенциал действия (нервный импульс) в нейроне; открытие трансдукционных каналов деполяризует мембрану клетки и способствует высвобождению нейротрансмиттера (рис. 1).

На дрозофиле был открыт еще один член семейства TRP – белок NOMPC (No Mechanoreceptor Potential C), который является порообразующей субъединицей канала механотрансдукции и экспрессируется в нейронах класса III (Yan et al., 2013). Исследование нулевых мутантов по гену *nompC* показало, что у них практически прекращается ток трансдукции, однако они слабо, но все же могут реагировать на механические раздражения, что указывает на присутствие дополнительного канала с подобной функцией, который еще предстоит идентифицировать (Göpfert et al., 2006). Предполагается, что NOMPC и подобные ему каналы трансдукции связаны с цитоскелетом (Clark et al., 2008; Liang et al., 2011).

Нарушение работы каналов TRP лежат в основе многих заболеваний. Неконтролируемая активность TRP-каналов также может иметь патологические последствия и вызывать нейродегенерацию, вызванную окислительным стрессом.

СВЯЗЬ КАНАЛОВ TRP С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Нарушения структуры или потеря функции ионных каналов TRP приводят к развитию различных заболеваний, называемых каналопатиями. Колебания уровня экспрессии TRP по ряду разных причин, их сенсibilизация или десенсibilизация также могут косвенно способствовать возникновению ряда эффектов. Такие косвенные эффекты могут проявляться через усиление или ослабление ответов на различные патологические стимулы. Существует несколько примеров каналов TRP, которые связаны с заболеваниями (Nilius et al., 2005), и множество примеров каналов TRP, связанных с болезненными состояниями (Nilius et al., 2005; Abramowitz, Birnbaumer, 2009). Например, дисфункция канонических TRP играет роль в развитии астмы и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), которая приводит к хроническому бронхиту и эмфиземе. Нарушения в работе канала TRPV1 приводят к возникновению болевых ощущениях при таких состояниях, как невропатическая боль, гиперестезия (повышенная чувствительность к прикосновению или другим естественным раздражителям), гиперталгия (аномальная чувствительность к боли), аллодиния (болевые ощущения в ответ на безобидные раздражители) и спонтанная глущая боль.

Измененная экспрессия белков TRP часто приводит к туморогенезу. Например, сообщалось, что каналы TRPV1 и TRPV6; TRPC1 и TRPC6; TRPM4, TRPM5 и TRPM8; TRPV1 и TRPV2 связаны с раком груди (Prevarskaya et al., 2007). TRPV2 является потенциальным биомаркером и терапевтической мишенью при тройном негативном раке молочной железы (Lozano et al., 2018). Было показано, что TRPM3 способствует росту и аутофагии в светлоклеточной почечно-клеточной карциноме (Wong et al., 2019), TRPM4 сверхэкспрессируется в диффузной большой В-клеточной лимфоме (Hall et al., 2014).

Белки TRP распознают липополисахариды (LPS), также известные как эндотоксины. LPS-опосредованная активация TRPA1 была показана на мышцах (Meseguer et al., 2014) и мухах *Drosophila melanogaster* (Soldano et al., 2016).

Роль TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPM8 как терморесепторов, а также роль TRPV4 и TRPA1 как механоресепторов имеет важное клиническое значение; уменьшение хронической боли может быть возможно за счет воздействия на ионные каналы, участвующие в термо-, хемо- и механосенсорике, для снижения их чувствительности к раздражителям. Например, использование агонистов TRPV1 потенциально может ингибировать ноцицепцию на TRPV1, особенно в ткани поджелудочной железы, где отмечен высокий уровень его экспрессии. Было показано, что агонист TRPV1 капса-

ицин облегчает невропатическую боль (Winston, Lutz, 1988).

КЛАССИФИКАЦИЯ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА TRP

Ионные каналы жизненно необходимы практически для каждой клетки, поскольку обеспечивают генерацию импульса возбуждения и его проведение в нейронах, сердечной или скелетных мышцах и играют центральную роль в поддержании гомеостаза. Проницаемые для Ca^{2+} каналы имеют особое значение, так как Ca^{2+} является не только носителем заряда, но и одним из важнейших вторичных мессенджеров. До открытия TRP были известны два основных класса Ca^{2+} -проницаемых каналов: потенциал- и лиганд-зависимые (Hille, 1992). В отличие от них семейство каналов TRP представляет собой невероятно разнообразный по способу активации класс ионных каналов, проницаемых для Ca^{2+} . Канальные белки имеют шесть трансмембранных сегментов, S1–S6, и поровую петлю между сегментами S5 и S6 (рис. 2), что типично для потенциал-зависимых каналов, однако положительно заряженные аминокислотные остатки в сегменте S4 заменены незаряженными (Phillips et al., 1992). Кроме того, TRP млекопитающих, например, TRPV1, связывают специфические “лиганды”, такие как капсаицин (Caterina et al., 1997), тем не менее этот канал не считается типичным лиганд-зависимым каналом (Bohlen et al., 2010). Следовательно, если классифицировать каналы TRP по механизмам их активации и регуляции, они не принадлежат строго ни к одной из вышеперечисленных категорий каналов. Эти ионные каналы обладают относительно неселективной проницаемостью для катионов — они могут пропускать не только катионы кальция, но и натрия, и магния.

Семейство каналов TRP представляет собой большой и разнообразный класс белков, которые экспрессируются во многих тканях и типах клеток. Пионерское исследование Кольбера и Баргманна, когда по дефектной реакции на ароматические вещества и высокую осмотическую силу был обнаружен первый член подсемейства TRPV у *C. elegans*, показало, что TRP сохраняет консерватизм от нематод до человека (Colbert, Bargmann, 1995).

Поиск гомологии в базах данных EST (Expressed sequence tags) дал информацию о полной последовательности гомолога TRP у человека — TRPC1 (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). Следующие исследования идентифицировали членов подсемейства TRPC, основываясь на гомологии аминокислотной последовательности с каналами TRP и TRPL дрозофилы. Впоследствии несколько групп исследователей клонировали и секвенировали гены

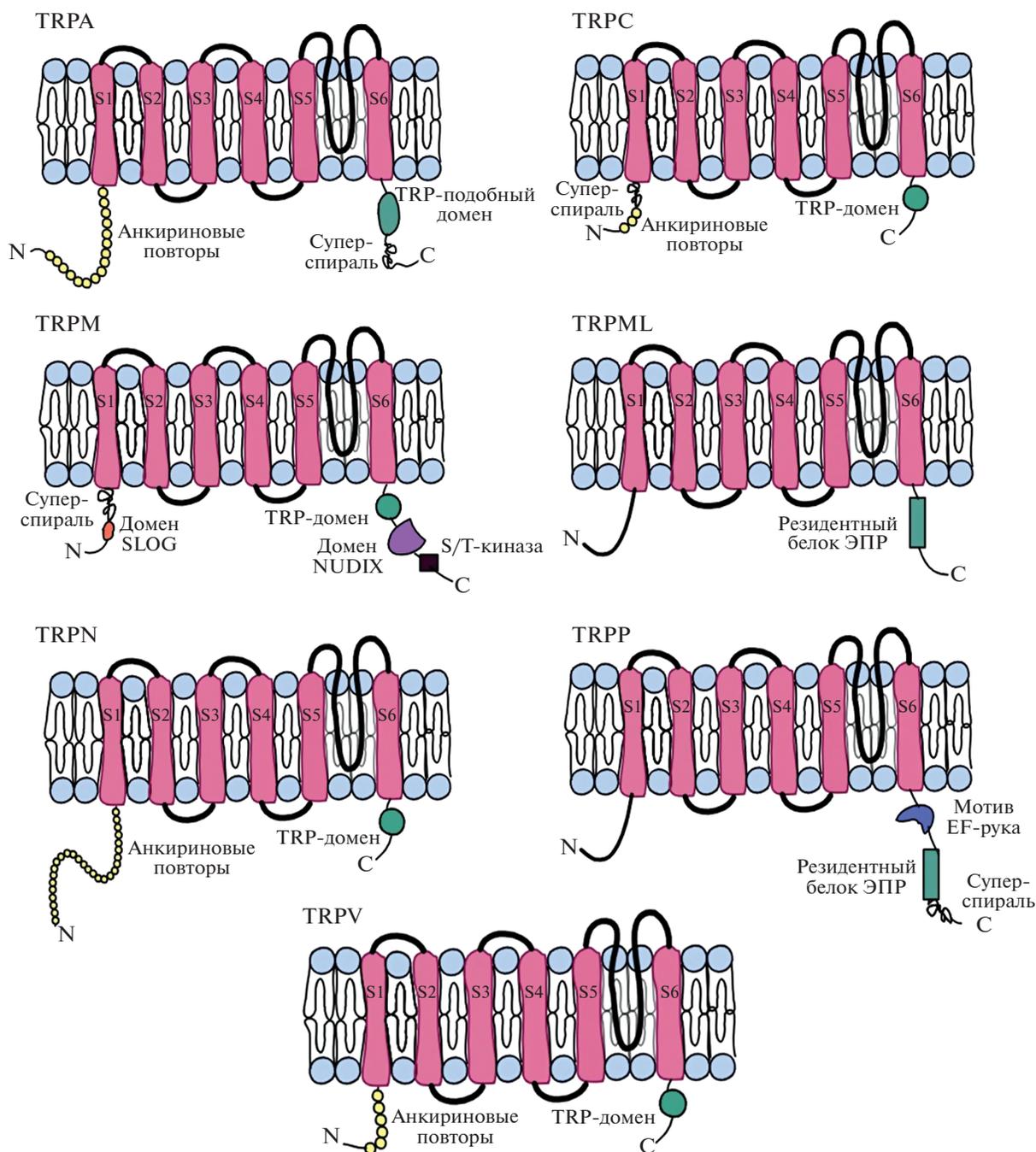


Рис. 2. Структурная организация канальных белков семейства TRP. TRP содержат шесть трансмембранных доменов (сегменты S1–S6) с поровой петлей между доменами S5 и S6; четыре идентичные субъединицы образуют функциональный канал. Обозначены внутриклеточные N- и C-концевые домены.

других подсемейств *TRP*. Каждый член семейства *TRP* имеет свой собственный специфический паттерн экспрессии, который различается в клетках и тканях, что предполагает их разнообразные функции. Гены *TRP* человека варьируют по длине (от 11,4 до примерно 911 т.п.н.) и числу экзонов (от 11 до 39). Общая гомология белковых последовательностей между членами подсемейства одного и того же вида обычно составляет около 35%,

но для пар, возникших в результате дупликаций (например, TRPC6 и TRPC7, TRPM4 и TRPM5, TRPV5 и TRPV6), этот показатель может достигать 50–80%. Регуляторные элементы в промоторах генов *TRP* не выявлены. Исследования на дрозофиле, которые сочетают генетический подход для определения роли отдельных факторов в сложной системе межгенных взаимодействий с мощными электрофизиологическими методами и методами

измерения концентрации Ca^{2+} в одной клетке, могут дать важные подсказки относительно механизма активации, по крайней мере, каналов TRPC млекопитающих, которые имеют относительно высокое структурное сходство с TRP и TRPL дрожжей.

Каналы TRP значительно диверсифицировались в ходе эволюции, приобретая разные доменные структуры, изменяя специфичность модальности и рекрутируясь в различные типы тканей: от почечной до нервной.

Взрыв интереса к каналам TRP за последние два десятилетия привел к радикальной реструктуризации семейства. По текущим данным у животных девять подсемейств TRP (Venkatachalam, Montell, 2007; Peng et al., 2015; Himmel et al., 2020): TRPP (P – полицистин), TRPML (ML – муколипин), TRPA (A – анкирин), TRPV (V – ванилоид), TRPVL (VL – ванилоидоподобный), TRPC (C – канонический), TRPN (N – поперС или отсутствие механорецепторного потенциала С), TRPM (M – меластатин) и TRPS (S – соромеластатин) (табл. 1).

Каналы TRP принято подразделять на две основные группы (Montell, 2005; Venkatachalam, Montell, 2007): Группа 1 (TRPA, TRPM, TRPN, TRPS, TRPV и TRVL) и Группа 2 (TRPP и TRML и, возможно, TRPY/TRPF). Животные, хоанофлагелляты, апузозои, альвеоляты и зеленые водоросли имеют рецепторы как в группе 1, так и в группе 2 (Huang et al., 2007; Fujiu et al., 2011; Agias-Darraz et al., 2015; Peng et al., 2015). TRP-каналы были описаны у различных эукариот, но их нет ни у архей, ни у бактерий. Этот факт предполагает, что TRP-каналы обрели узнаваемую форму на раннем этапе эволюции эукариот.

Подсемейства TRP

Подсемейство TRPA. *TRPA1* и родственные гены кодируют шесть трансмембранных сегментов, охватывающих ионные каналы, которые собираются в виде гомотетрамеров. Ряд высококонсервативных анкириновых повторов составляет основную часть N-концевого домена, в то время как С-концевой домен (CTD) содержит суперспираль и так называемый TRP-подобный домен, необходимый для связывания лиганда (Paulsen et al., 2015). Первоначально ассоциированный с фибробластами человека (Jaquemar et al., 1999) *TRPA1* вскоре был идентифицирован как активируемый температурой канал TRP (Story et al., 2003; Viswanath et al., 2003). В настоящее время известно, что он является полимодальным: имеет чувствительность к высокой температуре и холоду (Viswanath et al., 2003; Laursen et al., 2015), механическим стимуляциям (Corey et al., 2004), гипоксической воде (Ogino, Toyohara, 2019), электрофильным

химическим веществам (Jordt et al., 2004; Bautista et al., 2005; Hinman et al., 2006), коричному альдегиду (Bandell et al., 2004), каннабиноидам (Jordt et al., 2004), ментолу (Ogino, Toyohara, 2019), ицилину (Rawls et al., 2007), активным формам кислорода (Arenas et al., 2017) и эндогенным молекулам, возникающими в ответ на повреждение тканей (Viana, 2016).

Подсемейство TRPC. Подсемейство TRPC (“С” означает канонический) названо по одноименному семейству каналов *Drosophila* – TRP. В структуру каналов TRPC входит С-концевой домен TRP, N-концевые анкириновые повторы и суперспираль (Duan et al., 2018; Tang et al., 2018; Duan et al., 2019; Wang et al., 2020). TRPC присутствуют во всех таксонах животных, включая шесть TRPC-каналов, экспрессирующихся у человека. Мутации в каналах TRPC вызывают респираторные заболевания и фокальный сегментарный гломерулосклероз в почках. Все каналы TRPC активируются либо фосфолипазой С (PLC), либо диацилглицерином (DAG) (Wang et al., 2020).

Подсемейство TRPM. Подсемейство TRPM (“М” означает меластатин) было названо по гену меластатина (*MLSN1*), теперь переименованного в *TRPM1* (*Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 1*). Экспрессия *TRPM1* отрицательно коррелирует с агрессивностью меланомы, предполагая роль этого канала в подавлении ее метастазирования. В структуру TRPM входят шесть трансмембранных доменов, высококонсервативный N-концевой домен SLOG (с неизвестной функцией), С-концевой домен TRP (общий с TRPN, TRPC, TRPS и TRPV) и варибельный STD, который может включать NUDIX-гидролаза-подобный домен и/или альфа-киназу (Venkatachalam, Montell, 2007; Yin et al., 2018; Diver et al., 2019; Yin et al., 2019; Himmel et al., 2020). Дело в том, что в отличие от белков подсемейств TRPC и TRPV, TRPM не содержат N-концевые анкириновые повторяющиеся мотивы, зато на своих С-концах могут иметь целые функциональные белки. *TRPM6* и *TRPM7*, например, содержат функциональные домены α -киназы, которая представляет собой тип серин/треонин-специфической протеинкиназы.

Недавно реорганизованное семейство TRPM было разделено на подсемейства α TRPM и β TRPM. Среди млекопитающих большинство TRPM служат Ca^{2+} -проводящими сенсорами в ответ на различные стимулы (Huang et al., 2020). Есть некоторые свидетельства того, что каналы TRPM имеют общую функциональную направленность. Например, как TRPM8 позвоночных (β TRPM), так и Trpm8 дрожжей (α TRPM) функционируют при восприятии холода и ментола соответственно (Himmel et al., 2019). У позвоночных активность α TRPM (*TRPM6* и *TRPM7*) позволяет им функционировать как

Таблица 1. Подсемейства TRP: члены, таксоны и функции

Подсемейство TRP	Члены подсемейства	Таксоны	Известные функции
TRPA	<i>TRPA1, TRPA1-like, TRPA5, painless, pухexia, waterwitch, HsTRPA</i>	Хоанофлагеллаты, книдарии, экдизоии, лоботрохозоа, членистоногие, млекопитающие	Восприятие температуры, механических возмущений, гипоксической воды, электрофильных химических веществ, коричного альдегида, каннабиноидов, ментола, ицилина, активных форм кислорода и эндогенных молекул, связанных с повреждением тканей
TRPC	<i>TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7</i>	Водоросли, хоанофлагеллаты, членистоногие, млекопитающие	Повышенная регуляция генов наблюдается при сердечных заболеваниях, включая образование фибробластов; участвуют в гипертрофии сердца
TRPM	<i>TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7, TRPM8</i>	Книдарии, хоанофлагеллаты, членистоногие, млекопитающие	Регуляция кальциевых колебаний после активации T-клеток и предотвращение нарушений сердечной проводимости (TRPM4). Модуляция секреции инсулина и сенсорной трансдукции во вкусовых клетках (TRPM5). Ощущение холода (TRPM8). Ощущение жара и воспалительная боль (TRPM3). Регулирование реабсорбции магния в почках и всасывания в кишечнике (TRPM6). Регуляция клеточной адгезии (TRPM7)
TRPML	<i>MCOLN1, MCOLN2, MCOLN3</i>	Некоторые грибы, книдарии, губки, плактозоа, амёбозои, альвеолаты, млекопитающие.	Ответственны за поддержание pH лизосомы (TRPML1)
TRPN	<i>NompC, Trp-4, Nompс, Trpn1</i>	Большинство животных, кроме амниот	Механосенсорная функция. Играют роль в проприоцепции и слухе
TRPP	<i>PKD1, PKDREJ, PKDIL1, PKDIL2, PKDIL3, TRPP1, PKD2, TRPP2, PKD2L1, TRPP3, PKD2L2</i>	Имеются у животных от дрожжей до млекопитающих, наиболее древнее подсемейство	Механосенсорная функция, восприятие холода, тургор клеток (дрожжи)
TRPS	<i>Ced-11</i>	Животные, кроме позвоночных и насекомых	Участие в апоптозе
TRPV	<i>Nanchung, Inactive, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6</i>	Протисты, плактозоа, книдарии, нематоды, кольчатые черви, моллюски и членистоногие (возможно, за исключением паукообразных)	Реагируют на вкус чеснока (аллицин). Участвуют в ощущении жара и воспаления, опосредуют восприятие острого запаха и болевых ощущений от капсаицина и пиперина
TRPY1	<i>TRPY1, TRPFI-5</i>	Грибы	Локализован в дрожжевой вакуоли, которая является функциональным эквивалентом лизосомы в клетке млекопитающего, действует как сенсор осмотического давления

Mg²⁺-каналы, так и как протеинкиназы. Третье предполагаемое подсемейство, TRPM (ранее называвшееся TRPMm), было обнаружено у некоторых членистоногих и, возможно, книдарий; однако его присутствие внутри этих таксонов непостоянно и филогенетическое положение нестабильно.

Подсемейство TRPML. Подсемейство TRPML было названо по гену муколипина-1 (*MCOLN1*), переименованного в *TRPML1*. Мутации в этом гене нарушают клеточные функции, которые ведут к патологии нервной системы и развитию нейродегенеративного заболевания муколипидоз IV типа (Bargal et al., 2000). У большинства беспозвоночных есть один TRPML, тогда как у позвоночных их три: TRPML1–3 (Peng et al., 2015). Книдарии, губки, плакозоа и хоанофлагеллаты также имеют TRPML, но филогенетическое положение этих рецепторов описано недостаточно (Peng et al., 2015). Считается, что у млекопитающих и насекомых TRPML1 и TRPML локализованы в поздних эндосомах и лизосомах соответственно (Pryor et al., 2006). Напротив, считается, что TRPML2 и TRPML3 млекопитающих локализируются на клеточной плазматической мембране, как и другие канонические каналы TRP, где они функционируют в регуляции эндосомального пути и врожденного иммунитета (Sun et al., 2015). Структура и физиология TRPML лучше всего изучена у млекопитающих (Fine et al., 2020) и остается недостаточно изученной у других организмов.

Подсемейство TRPN. Подсемейство TRPN было названо из-за мутанта дрозофилы по гену *nompC* (*no mechanoreceptor potential C*), который имеет дефекты в механосенсорной трансдукции. *nompC* экспрессируется в механосенсорных органах дрозофилы. Его мутации с потерей функции подавляют ответ механорецепторов на стимулы, а точечная мутация изменяет ток трансдукции через канал (Walker et al., 2000). *nompC* экспрессируется в периферических сенсорных нейронах и кодирует порообразующую субъединицу механосенсорного неселективного катионного канала. В ходе эволюции таксонов билатеральных животных происходило нескольких независимых дупликаций всего генома, однако оказалось, что в их геномах присутствует только один TRPN (Schüler et al., 2015). Каналы TRPN практически не изменились в ходе эволюции, обычно содержат 28–29 анкириновых повторов и домен TRP. Было продемонстрировано, что для функционирования белков TRPN решающее значение имеет связывание анкириновых повторов с микротрубочками (Zhang et al., 2015). В первую очередь TRPN участвуют в механосенсорике (Walker et al., 2000; Cheng et al., 2010). *NompC* дрозофилы также необходим для холодовой ноцицепции личинок, хотя механизмы этого процесса неизвестны (Turner et al., 2016).

Подсемейство TRPP. Подсемейство TRPP (“P” означает полицистин) названо из-за поликистоза почек, вызванного мутациями генов, кодирующих белки подсемейства (Mochizuki et al., 1996). Эти каналы также называют ионными каналами PKD (поликистозная болезнь почек). Они содержат структурный мотив “EF-рука”, связывающий ионы Ca²⁺. Что касается их функции, как и многие родственные белки, TRPP мультимодальны и наиболее хорошо изучены у млекопитающих (Fine et al., 2020). У *Drosophila* эти рецепторы функционируют при восприятии холода (Turner et al., 2016). На данный момент у дрожжей известны два TRPP, называемые Pkd2 и Pkd2p, которые контролируют тургор клетки, синтез клеточной стенки и разделение клеток на стадии цитокинеза (Morris et al., 2019).

Подсемейство TRPS. TRPS (“S” означает соромеластатин) – это недавно открытое подсемейство TRP, названное в связи с его положением в качестве сестринской группы по отношению к TRPM (Himmel et al., 2020). TRPS относительно широко экспрессируется среди билатеральных, но является одним из наиболее малоизученных семейств TRP, возможно, потому что его нет у позвоночных или насекомых. TRPS есть у моллюсков, нематод, тихоходок, многоножек и хелицерат (включая паукообразных) (Himmel et al., 2020). Однако функция TRPS остается в основном загадкой. Функционально охарактеризован только один член у *C. elegans* – *ced-11*, который кодирует кальциевый канал, участвующий в апоптозе (Driscoll et al., 2017). Структура каналов TRPS еще не выяснена, известно только, что они содержат характерные шесть трансмембранных доменов, которые идентифицировали с помощью метода поиска гомологичных последовательностей.

Подсемейство TRPV. Подсемейство TRPV (“V” означает ваниллоид) названо из-за чувствительности члена этого семейства TRPV1 к двум ваниллоидным соединениям – капсаицину и резинифератоксину. Гены *TRPV* кодируют канонический 6-трансмембранный сегмент, охватывающий ионные каналы, характеризующийся N-концевыми анкириновыми повторами и C-концевым доменом TRP. Каналы TRPV впервые описаны у млекопитающих (VR1, переименован в TRPV1) (Caterina et al., 1997) и у *C. elegans* (OSM-9) (Colbert et al., 1997). Один из двух локусов *TRPV* дрозофилы исходно был описан В.Д. Капланом в ходе исследования мутации *inactive* (*iav*) (Kaplan, 1977). В течение следующих двух десятилетий фенотип мутантов *iav* был ассоциирован с нарушениями ритуала ухаживания и локомоции (Номук, Sheppard, 1977), а также аномальной реакцией на кокаин (McClung, Hirsh, 1999). Почти 30 лет спустя *iav* был охарактеризован как ген, кодирующий один из двух каналов TRPV дрозофилы (Gong et al., 2004).

Подсемейство TRPY1. TRPY1 (“Y” – yeast – дрожжи) был первым специфичным каналом TRP, открытым у грибов (Palmer et al., 2001). С тех пор группа этих рецепторов была расширена за счет включения в нее TRPF1–5 (Lange et al., 2016). Точная структура этих каналов не выяснена, но считается, что TRPY1 образует внутриклеточный кальциевый канал, который открывается в ответ на повышение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , осмотический шок, механические деформации и ароматические соединения (Palmer et al., 2001; Denis, Cyert, 2002). У дрожжей TRPY1 локализован в вакуоли (функциональном эквиваленте лизосомы клеток млекопитающих) и действует как сенсор осмотического давления (Palmer et al., 2001). Как и *TRPY1*, гены *TRPF* кодируют внутриклеточные каналы. Однако они не блокируют Ca^{2+} в ответ на осмотический шок, и функции, в которых они активно участвуют, неизвестны (Lange et al., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семейство ионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP-каналы) широко известно благодаря той роли, которую его члены играют в сенсорной системе. Однако невероятное разнообразие внутри семейства TRP и широкий спектр сенсорных ощущений, в которых задействованы белки этого семейства, позволили им участвовать не только в восприятии окружающей среды, но и регистрировать изменения состояния внутренней среды организма. В результате каналы TRP стали важнейшими рецепторами, обеспечивающими жизнедеятельность животных. Первоначально каналы TRP были обнаружены у дрозофилы и с тех пор широко изучались на этих организмах; однако благодаря буму геномных и транскриптомных данных мы узнали, что TRP-каналы есть у самых разных существ, включая зеленые водоросли, грибы, хоанофлагеллаты и ряд других эукариот.

Учитывая, насколько древними являются большинство TRP-семейств, а также их широкий паттерн экспрессии, можно прогнозировать, что дальнейшие исследования будут способствовать накоплению информации об их роли за пределами нервной системы. Возможно, это связано с тем, что сами каналы TRP, способные контролировать сенсорные системы, обуславливающие поведение, возникли раньше нервной системы. Можно сказать, что каналы TRP способствовали эволюции поведенческих и физиологических реакций, а также развитию нервной системы, сигнальных механизмов в почках и т.п., адаптировав организмы к выживанию в окружающей среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00272а) и в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2022 года № 0088-2021-0007 “Молекулярно-генетические механизмы регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.Е. Куваева проводила анализ мировой литературы и участвовала в написании основного текста статьи. И.Б. Мерцалов участвовал в редактировании и обсуждении текста статьи. О.Б. Симонова инициировала написание обзора и редактировала текст.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abed-Vieillard D., Cortot J., Everaerts C. et al.* Choice alters *Drosophila* oviposition site preference on menthol // *Biology Open*. 2014. V. 3. № 1. P. 22–28.
- Abramowitz J., Birnbaumer L.* Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels // *FASEB J*. 2009. V. 23. № 2. P. 297–328.
- Aceves-Piña E.O., Quinn W.G., Smith K.D. et al.* Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae // *Science*. 1979. V. 206. № 4414. P. 93–96.
- Arenas O.M., Zaharieva E.E., Para A. et al.* Activation of planarian TRPA1 by reactive oxygen species reveals a conserved mechanism for animal nociception // *Nat. Neurosci*. 2017. V. 20. № 12. P. 1686–1693.
- Arias-Darraz L., Cabezas D., Colenso C.K. et al.* A transient receptor potential ion channel in *Chlamydomonas* shares key features with sensory transduction-associated TRP channels in mammals // *Plant Cell*. 2015. V. 27. № 1. P. 177–188.
- Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V. et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and Bradykinin // *Neuron*. 2004. V. 41. № 6. P. 849–857.
- Bargal R., Avidan N., Ben-Asher E. et al.* Identification of the gene causing mucopolidosis type IV // *Nat. Genet*. 2000. V. 26. № 1. P. 118–122.
- Bautista D.M., Movahed P., Hinman A. et al.* Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 34. P. 12248–12252.
- Bohlen C.J., Priel A., Zhou S. et al.* A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the

- outer pore domain // *Cell*. 2010. V. 141. № 5. P. 834–845.
- Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor // *Science*. 2000. V. 288. № 5464. P. 306–313.
- Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat // *Nature*. 1999. V. 398. № 6726. P. 436–441.
- Caterina M.J., Schumacher M., Tominaga M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature*. 1997. V. 389. № 6653. P. 816–824.
- Cheng L.E., Song W., Looger L.L. et al. The role of the TRP channel NompC in *Drosophila* larval and adult locomotion // *Neuron*. 2010. V. 67. № 3. P. 373–380.
- Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors // *Nature*. 2003. V. 426. № 6966. P. 517–524.
- Clark K., Middelbeek J., van Leeuwen F.N. Interplay between TRP channels and the cytoskeleton in health and disease // *Eur. J. Cell. Biol.* 2008. V. 87. № 8–9. P. 631–640.
- Colbert H.A., Bargmann C.I. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans* // *Neuron*. 1995. V. 14. № 4. P. 803–812.
- Colbert H.A., Smith T.L., Bargmann C.I. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans* // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 21. P. 8259–8269.
- Corey D.P., García-Añoveros J., Holt J.R. et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells // *Nature*. 2004. V. 432. № 7018. P. 723–730.
- Corfas G., Dudai Y. Adaptation and fatigue of a mechanosensory neuron in wild-type *Drosophila* and in memory mutants // *J. Neurosci.* 1990. V. 10. № 2. P. 491–499.
- Cosens D.J., Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant // *Nature*. 1969. V. 224. № 5216. P. 285–287.
- Dadon D., Minke B. Cellular functions of transient receptor potential channels // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 42. № 9. P. 1430–1445.
- Denis V., Cyert M.S. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue // *J. Cell Biol.* 2002. V. 156. № 1. P. 29–34.
- Diver M.M., Cheng Y., Julius D. Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization // *Science*. 2019. V. 365. № 6460. P. 1434–1440.
- Driscoll K., Stanfield G.M., Droste R. et al. Presumptive TRP channel CED-11 promotes cell volume decrease and facilitates degradation of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 33. P. 8806–8811.
- Duan J., Li J., Chen G.L. et al. Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-Å resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 7. eaaw 7935.
- Duan J., Li J., Zeng B. et al. Structure of the mouse TRPC4 ion channel // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 3102.
- Fine M., Li X., Dang S. Structural insights into group II TRP channels // *Cell Calcium*. 2020. V. 86. № 102107.
- Fujiu K., Nakayama Y., Iida H. et al. Mechanoreception in motile flagella of *Chlamydomonas* // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. № 5. P. 630–632.
- Gong Z., Son W., Chung Y.D. et al. Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in *Drosophila* // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 41. P. 9059–9066.
- Göpfert M.C., Albert J.T., Nadrowski B. et al. Specification of auditory sensitivity by *Drosophila* TRP channels // *Nat. Neurosci.* 2006. V. 9. № 8. P. 999–1000.
- Hall D.P., Cost N.G., Hegde S. et al. TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma // *Cancer Cell*. 2014. V. 26. № 5. P. 738–753.
- Hardie R.C., Minke B. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors // *Neuron*. 1992. V. 8. № 4. P. 643–651.
- Hardie R.C., Raghu P. Visual transduction in *Drosophila* // *Nature*. 2001. V. 413. № 6852. P. 186–193.
- Hille B. Ionic channels of excitable membranes (2). Sunderland, MA: Sinauer Associate, Inc., 1992. 790 p.
- Himmel N.J., Gray T.R., Cox D.N. Phylogenetics identifies two eumetazoan TRPM clades and an eighth TRP family, TRP Soromelastatin (TRPS) // *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 37. № 7. P. 2034–2044.
- Himmel N.J., Letcher J.M., Sakurai A. et al. *Drosophila* menthol sensitivity and the Precambrian origins of transient receptor potential-dependent chemosensation // *Phil. Trans. R. Soc.* 2019. V. 374. № 1785/0369.
- Hinman A., Chuang H.-H., Bautista D.M. et al. TRP channel activation by reversible covalent modification // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 51. P. 19564–19568.
- Homyk T., Sheppard D.E. Behavioral mutants of *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and mapping of mutations which decrease flight ability // *Genetics*. 1977. V. 87. № 1. P. 95–104.
- Huang K., Diener D.R., Mitchell A. et al. Function and dynamics of PKD2 in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella // *J. Cell Biol.* 2007. V. 179. № 3. P. 501–514.
- Huang Y., Fliegert R., Guse A.H. et al. A structural overview of the ion channels of the TRPM family // *Cell Calcium*. 2020. V. 85. P. 10211.
- Jaquemar D., Schenker T., Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 11. P. 7325–7333.
- Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1 // *Nature*. 2004. V. 427. № 6971. P. 260–265.
- Julius D. From peppers to peppermints: natural products as probes of the pain pathway // *Harvey Lect.* 2005. V. 101. P. 89–115.
- Kang K., Pulver S.R., Panzano V.C. et al. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 597–600.
- Kaplan W.D. iav: inactive // *Drosophila Inform. Serv.* 1977. V. 52. № 1.
- Katz B., Minke B. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms // *Front. Cell Neurosci.* 2009. V. 32.

- Kernan M., Cowan D., Zuker C.* Genetic dissection of mechanosensory transduction: mechanoreception-defective mutations of *Drosophila* // *Neuron*. 1994. V. 12. № 6. P. 1195–1206.
- Kernan M., Zuker C.* Genetic approaches to mechanosensory transduction // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995. V. 5. № 4. P. 443–448.
- Lange M., Weihmann F., Schliebner I. et al.* The transient receptor potential (TRP) channel family in *Colletotrichum graminicola*: a molecular and physiological analysis // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 6. e0158561.
- Laursen W.J., Anderson E.O., Hoffstaetter L.J. et al.* Species-specific temperature sensitivity of TRPA1 // *Temperature*. 2015. V. 2. № 2. P. 214–226.
- Li Y., Bai P., Wei L. et al.* Capsaicin functions as *Drosophila* ovipositional repellent and causes intestinal dysplasia // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. № 1. P. 9963.
- Liang X., Madrid J., Saleh H.S. et al.* NOMPC, a member of the TRP channel family, localizes to the tubular body and distal cilium of *Drosophila* campaniform and chordotonal receptor cells // *Cytoskeleton*. 2011. V. 68. № 1. P. 1–7.
- Lopez-Bellido R., Himmel N.J., Gutstein H.B. et al.* An assay for chemical nociception in *Drosophila* larvae // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2019. V. 374. № 1785: 20190282.
- Lozano C., Córdova C., Marchant I. et al.* Intracellular aggregated TRPV1 is associated with lower survival in breast cancer patients // *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2018. V. 10. P. 161–168.
- McClung C., Hirsh J.* The trace amine tyramine is essential for sensitization to cocaine in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. № 16. P. 853–860.
- McKemy D., Neuhausser W., Julius D.* Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature*. 2002. V. 416. P. 52–58.
- Meseguer V., Alpizar Y.A., Luis E. et al.* TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins // *Nat. Commun.* 2014. V. 5: 3125.
- Miller B.A.* The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death // *J. Membr. Biol.* 2006. V. 209. № 1. P. 31–41.
- Minke B., Cook B.* TRP channel proteins and signal transduction // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 429–472.
- Mochizuki T., Wu G., Hayashi T. et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein // *Science*. 1996. V. 272. № 5266. P. 1339–1342.
- Montell C.* Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels // *Sci STKE*. 2001. V. 2001. № 90. P. 1–17.
- Montell C.* The TRP superfamily of cation channels // *Sci. Signal*. 2005. № 272: re3.
- Montell C., Rubin G.M.* Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction // *Neuron*. 1989. V. 2. № 4. P. 1313–1323.
- Morris Z., Sinha D., Poddar A. et al.* Fission yeast TRP channel Pkd2p localizes to the cleavage furrow and regulates cell separation during cytokinesis // *Mol. Biol. Cell*. 2019. V. 30. № 15. P. 1791–1804.
- Nicholls J.G., Baylor D.A.* Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech // *J. Neurophysiol.* 1968. V. 31. № 5. P. 740–756.
- Nilius B., Mahieu F.* A road map for TR(I)Ps // *Mol. Cell*. 2006. V. 22. № 3. P. 297–307.
- Nilius B., Voets T.* TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels // *Pflugers Arch.* 2005. V. 451. № 1. P. 1–10.
- Nilius B., Voets T., Peters J.* TRP channels in disease // *Sci. STKE*. 2005. № 295: re8.
- Nishida M., Hara Y., Yoshida T. et al.* TRP channels: molecular diversity and physiological function // *Microcirculation*. 2006. V. 13. № 7. P. 535–550.
- Ogino T., Toyohara H.* Identification of possible hypoxia sensor for behavioral responses in a marine annelid, *Capitella teleta* // *Biol. Open*. 2019. V. 8. bio037630.
- Palermo N.N., Brown H.K., Smith D.L.* Selective neurotoxic action of capsaicin on glomerular C-type terminals in rat substantia gelatinosa // *Brain Res.* 1981. V. 208. № 2. P. 506–510.
- Palmer C.P., Zhou X.-L., Lin J. et al.* A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 14. P. 7801–7805.
- Pastor J., Soria B., Belmonte C.* Properties of the nociceptive neurons of the leech segmental ganglion // *J. Neurophysiol.* 1996. V. 75. № 6. P. 2268–2279.
- Paulsen C.E., Armache J.-P., Gao Y. et al.* Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms // *Nature*. 2015. V. 525. № 7570. P. 511–517.
- Peier A.M., Moqrich A., Patapoutian A. et al.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // *Cell*. 2002a. V. 108. № 5. P. 705–715.
- Peier A.M., Reeve A.J., Andersson D.A. et al.* A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes // *Science*. 2002b. V. 296. № 5575. P. 2046–2049.
- Peng G., Shi X., Kadowaki T.* Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015. V. 84. P. 145–157.
- Phillips A.M., Bull A., Kelly L.E.* Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene // *Neuron*. 1992. V. 8. № 4. P. 631–642.
- Prevarskaya N., Zhang L., Barritt G.* TRP channels in cancer // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1772. № 8. P. 937–946.
- Pryor P.R., Reimann F., Gribble F.M. et al.* Mucolipin-1 is a lysosomal membrane protein required for intracellular lactosylceramide traffic // *Traffic*. 2006. V. 7. № 10. P. 1388–1398.
- Quinn W.G., Harris W.A., Benzer S.* Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. № 3. P. 708–712.
- Rawls S.M., Gomez T., Ding Z. et al.* Differential behavioral effect of the TRPM8/TRPA1 channel agonist icilin (AG-3-5) // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. V. 575. № 1–3. P. 103–104.
- Schüler A., Schmitz G., Reft A. et al.* The Rise and Fall of TRP-N, an ancient family of mechanogated ion channels, in Metazoa // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7. № 6. P. 1713–1727.

- Soldano A., Alpizar Y.A., Boonen B. et al.* Gustatory-mediated avoidance of bacterial lipopolysaccharides via TRPA1 activation in *Drosophila* // eLife. 2016. № 5. e13133.
- Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J. et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures // Cell. 2003. V. 112. № 6. P. 819–829.
- Sun L., Hua Y., Vergarajauregui S. et al.* Novel role of TRPML2 in the regulation of the innate immune response // J. Immunol. 2015. V. 195. № 10. P. 4922–4932.
- Tang Q., Guo W., Zheng L. et al.* Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels // Cell Res. 2018. V. 28. P. 746–755.
- Thurm U.* An insect mechanoreceptor. Part I. Fine structure and adequate stimulus // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1965. V. 30. P. 75–82.
- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B. et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli // Neuron. 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
- Tracey W.D., Wilson R.I., Laurent G. et al.* Painless, a *Drosophila* gene essential for nociception // Cell. 2003. V. 113. № 2. P. 261–273.
- Turner H.N., Armengol K., Patel A.A. et al.* The TRP channels Pkd2, NompC, and Trpm act in cold-sensing neurons to mediate unique aversive behaviors to noxious cold in *Drosophila* // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 23. P. 3116–3128.
- Venkatachalam K., Montell C.* TRP channels // Annu. Rev. Biochem. 2007. V. 76. P. 387–417.
- Viana F.* TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage // J. Physiol. 2016. V. 594. № 15. P. 4151–4169.
- Viswanath V., Story G.M., Peier A.M. et al.* Opposite thermosensor in fruitfly and mouse // Nature. 2003. V. 423. № 6942. P. 822–823.
- Walker R.G., Willingham A.T., Zuker C.S.* A *Drosophila* mechanosensory transduction channel // Science. 2000. V. 287. № 5461. P. 2229–2234.
- Walters E.T., Williams A.C.C.* Evolution of mechanisms and behaviour important for pain // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2019. V. 374. № 1785: 20190275.
- Wang H., Cheng X., Tian J. et al.* TRPC channels: structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes // Pharmacol. Ther. 2020. V. 209. № 1. P. 497–107.
- Wes P.D., Chevesich J., Jeromin A. et al.* TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 21. P. 9652–9656.
- Winston K.R., Lutz W.* Linear accelerator as a neurosurgical tool for stereotactic radiosurgery // Neurosurgery. 1988. V. 22. № 3. P. 454–464.
- Wong F., Schaefer E.L., Roop B.C. et al.* Proper function of the *Drosophila* *trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult // Neuron. 1989. V. 3. № 1. P. 81–94.
- Wong K.K., Banham A.H., Yaacob N.S. et al.* The oncogenic roles of TRPM ion channels in cancer // J. Cellular Physiology. 2019. V. 234. P. 14556–14573.
- Yan Z., Zhang W., He Y. et al.* *Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation // Nature. 2013. V. 493. P. 221–225.
- Yin Y., Le S.C., Hsu A.L. et al.* Structural basis of cooling agent and lipid sensing by the cold-activated TRPM8 channel // Science. 2019. V. 363. № 6430. eaav 9334.
- Yin Y., Wu M., Zubcevic L. et al.* Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8 // Science. 2018. V. 359. P. 237–241.
- Zhang W., Cheng L.E., Kittelmann M. et al.* Ankyrin repeats convey force to gate the NOMPC mechanotransduction channel // Cell. 2015. V. 162. № 6. P. 1391–1403.
- Zhu X., Chu P.B., Peyton M. et al.* Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* *trp* gene // FEBS Lett. 1995. V. 373. № 3. P. 193–198.

Transient Receptor Potential Family of Channel Proteins – TRP

E. E. Kuvaeva¹, I. B. Mertsalov¹, and O. B. Simonova^{1,*}

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Proteins with a transient receptor potential (TRP) function in the cell membrane as Ca²⁺-permeable non-selective cation channels. TRP channels play a critical role in the functioning of sensory systems: visual, gustatory, olfactory, auditory, haptic, thermoregulatory, and osmoregulatory. Some members of this superfamily, as it turned out, play an important role in the control of growth, differentiation, proliferation, cell polarization, and apoptosis. TRP channels exhibit more diverse activation and selectivity mechanisms than any other group of ion channels – one TRP channel can be activated by multiple mechanisms. However, the TRP family proteins have in common that they play a decisive role in the perception of all major classes of external stimuli and are capable of definition the local changes in the internal environment. The explosion of interest in TRP channels over the past two decades has led to a radical restructuring of the family. The review is devoted to the description of channel proteins-receptors of the TRP family, the history of their study and classification.

Keywords: sensory systems, receptor, ion channels, TRP

ВЛИЯНИЕ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА КРИОКОНСЕРВАЦИЮ ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ЭКО ЭМБРИОНОВ ДОМАШНЕЙ КОШКИ

© 2022 г. С. В. Окотруб^{а, с}, Д. А. Лебедева^{а, с}, К. А. Окотруб^б, Э. А. Чуйко^а,
Е. Ю. Брусенцев^а, Т. А. Рахманова^{а, с}, С. Я. Амстиславский^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, пр. ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^бИнститут автоматики и электрометрии СО РАН, пр. Коптюга, 1, Новосибирск, 630090 Россия

^сНовосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

Изучение роли липидов в преимплантационном развитии млекопитающих является важной фундаментальной проблемой современной эмбриологии. Особенно это актуально при исследовании раннего развития представителей отряда хищных и некоторых других млекопитающих, ооциты и ранние эмбрионы которых содержат много внутриклеточных липидов. Одним из перспективных подходов к повышению криоустойчивости богатых липидами эмбрионов является модификация их липидома *in vitro*. Целью данной работы было изучение влияния линолевой кислоты (ЛК) на развитие эмбрионов домашней кошки *in vitro* и оценка того, как изменение состава и общего содержания внутриклеточных липидов влияет на эффективность их криоконсервации. Эмбрионы, полученные *in vitro* в результате экстракорпорального оплодотворения, культивировали с 400 мкМ ЛК в течение 66 ч, после чего случайным образом распределяли по трем группам: 1) для оценки общего количества липидов и стадии развития; 2) для исследования степени ненасыщенности и температуры начала фазового перехода липидов (T^*); 3) для криоконсервации при помощи программного замораживания. Воздействие ЛК при культивировании *in vitro* без криоконсервации не влияло на скорость развития эмбрионов. Окрашивание нильским красным не выявило изменений по количеству липидов в клетках после воздействия ЛК. Однако спектроскопия комбинационного рассеяния света показала, что степень ненасыщенности липидов была выше в эмбрионах после культивирования *in vitro* с ЛК. Воздействие ЛК приводило к снижению T^* , при этом наблюдали большее число ядер в blastocysts в группе ЛК после криоконсервации по сравнению с контролем, что свидетельствует о более высоком темпе развития таких эмбрионов с модифицированным липидным составом. Таким образом, воздействие ЛК при культивировании *in vitro* приводило к увеличению степени ненасыщенности липидов и снижению T^* эмбрионов домашней кошки, что отразилось на их развитии после криоконсервации.

Ключевые слова: домашняя кошка, преимплантационные эмбрионы, культивирование *in vitro*, линолевая кислота, криоконсервация, спектроскопия комбинационного рассеяния света

DOI: 10.31857/S0475145022050068

ВВЕДЕНИЕ

Изучение роли липидов в преимплантационном развитии млекопитающих является важной фундаментальной проблемой современной эмбриологии (Брусенцев и др., 2019; Idrissi et al., 2021a). В частности, исследование влияния липидных гранул в ходе созревания ооцитов и раннего развития эмбрионов млекопитающих находится в фокусе работ различных исследовательских групп (Welte, Gould, 2017; Ibayashi et al., 2021; Arena et al., 2021). Особенно актуальна эта проблема при ис-

следовании раннего развития представителей отряда хищных и некоторых других млекопитающих, ооциты и ранние эмбрионы которых содержат повышенное содержание внутриклеточных липидов (Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019; Bradley, Swann, 2019). Важным аспектом этой проблемы является изучение роли липидов в криорезистентности преимплантационных зародышей млекопитающих (Amstislavsky et al., 2019; Igonina et al., 2021; Брусенцев и др., 2022). Липидные гранулы (ЛГ) и цитоплазматические мембраны клеток чувствительны к охлаждению (Sieme et al.,

2015), а процессы, приводящие к криоповреждениям при замораживании, в частности, у богатых липидами преимплантационных эмбрионов остаются плохо изученными. Выяснение фундаментальных механизмов, лежащих в основе высокой криочувствительности богатых липидами эмбрионов является важной задачей (Pereira, Marques, 2008; Amstislavsky et al., 2019; Idrissi et al., 2021b).

Фазовый переход воды в процессе охлаждения является причиной повреждения клетки из-за механического разрушения, как цитоплазматической мембраны, так и различных органелл (Mazur, 1990). Мы предполагаем, что липиды, содержащиеся в больших количествах в ЛГ клеток эмбрионов, также претерпевают фазовый переход и могут инициировать повреждения, связанные с перераспределением и упорядочением их молекул. Фазовый переход липидов (ФПЛ) в клеточных мембранах и ЛГ приводит к фазовому разделению, которое возможно влияет на их функциональные свойства, в частности, их пространственное распределение и текучесть (Quinn, 1985; Mokrousova et al., 2020b). Одной из стратегий уменьшения повреждения клеток при криоконсервации является модификация состава ЛГ с целью смягчения эффектов ФПЛ. Было высказано предположение, что снижение температуры начала ФПЛ (T^*) повышает устойчивость репродуктивных клеток к замораживанию (Zeron et al., 2002). Установлено, что T^* зависит от степени ненасыщенности липидов (Zeron et al., 2002; Igonina et al., 2021). Поэтому важны исследования, направленные на модификацию состава внутриклеточных липидов, по изменению степени их ненасыщенности и, соответственно, влияния на T^* , а также на поиск корреляции этих изменений с криочувствительностью эмбрионов различных видов млекопитающих.

В исследованиях на разных видах животных было показано, что воздействие ненасыщенных жирных кислот (ЖК) при культивировании *in vitro*, в частности, линолевой кислоты (ЛК), улучшает развитие эмбрионов и их жизнеспособность (Fayez et al., 2018; Karasahin, 2019). Линолевая кислота может влиять на физические свойства биологических мембран, увеличивая их текучесть (Schmitz, Ecker, 2008), что может частично объяснить эти положительные эффекты. Однако исследования модификации содержания липидов в ходе преимплантационного эмбрионального развития до сих пор проводили преимущественно на крупном рогатом скоте и овцах (Amini et al., 2016; Dias et al., 2020) или на лабораторных мышах (Igonina et al., 2021), но не на видах отряда хищных.

Для семейства кошачьих (Felidae) характерны богатые липидами ооциты и преимплантационные зародыши (Crichton et al., 2003; Zahmel et al., 2021). В частности, ранние эмбрионы домашней кошки содержат большое количество внутрикле-

точных липидов (Amstislavsky et al., 2019). Изучение процессов, которые происходят при криоконсервации ранних эмбрионов домашних кошек, важно для понимания фундаментальных механизмов криочувствительности, в том числе репродуктивных клеток (Okotrub et al., 2018; Mokrousova et al., 2020a), а также может повлиять на успех применения концепции криобанка генетических ресурсов по отношению к диким видам кошачьих (Amstislavsky et al., 2012; Jewgenow, Zahmel, 2020). Наша гипотеза состоит в том, что не только общее количество внутриклеточных липидов, но и их качественный состав, в частности, степень ненасыщенности, может влиять на криоустойчивость преимплантационных эмбрионов домашней кошки, которая достигается благодаря изменению температуры начала ФПЛ.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении эффектов воздействия ненасыщенной ЛК в ходе культивирования, полученных в результате ЭКО эмбрионов домашних кошек на их развитие *in vitro* и криоустойчивость. В связи с этим были поставлены следующие задачи: 1) оценить изменение общего количества внутриклеточных липидов и степени их ненасыщенности в результате воздействия на преимплантационные эмбрионы домашней кошки ЛК при культивировании *in vitro*; 2) измерить температуру начала фазового перехода в процессе охлаждения эмбрионов домашней кошки как в контроле, так и после воздействия ЛК; 3) определить влияние ЛК на развитие преимплантационных зародышей кошек до и после криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Семенники с эпидидимисами домашних котов, а также яичники кошек получали после плановой орхиэктомии/овариогистерэктомии в пункте льготной стерилизации животных г. Новосибирска и доставляли в лабораторию. Яичники немедленно после операции помещали в среду "Collect": 50 мл M199 (Merck, Германия) с добавлением 20 мМ NEPES (Biofroxx, Германия), 2.2 мМ пирувата натрия (Biofroxx, Германия), 2.2 мМ лактата натрия (Fisher Chemical, Германия), 3 г/л бычьего сывороточного альбумина – БСА (Merck, Германия), 50 мкг/мл гентамицина (PanReac Applichem, США), и хранили при 4°C до 4 ч после операции. Семенники с эпидидимисами помещали в стерильные сухие пробирки и хранили при 4°C до 24 ч с момента орхиэктомии. Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики (протокол № 22.2 от 30 мая 2014 г.) и соответствовали стандартам Европейской конвенции по защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Получение и созревание ооцитов in vitro

Кумулюс-ооцитные комплексы (КОК-сы) выделяли из фолликулов в подогретой до 38.5°C среде "Collect", используя стереомикроскоп S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Ооциты с темной и гомогенной цитоплазмой, окруженные несколькими слоями клеток кумулюса, промывали для удаления дебриса и отбирали для созревания *in vitro*. Среда для созревания: 25 мл M199 в концентрации 9.5 г/л с добавлением 15 мМ бикарбоната натрия (Merck, Германия), 2.2 мМ пирувата натрия, 2.2 мМ лактата натрия, 3 г/л БСА, 50 мкг/мл гентамицина, 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека – Хорулон (Intervet international, B.V., Нидерланды) и 2 МЕ/мл хорионического гонадотропина лошади – Фоллигон (Intervet international, B.V., Нидерланды). Помещали КОК-сы в 4-луночный планшет (SPL, Южная Корея) с предварительно выдержанной не менее двух часов в атмосфере 5% CO₂ средой для дозревания (500 мкл на лунку), покрытой 400 мкл минерального масла FertiCult (FertiPro, Бельгия), и помещали в CO₂-инкубатор New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C, 5% CO₂, и 90% влажности на 24 ч.

Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение

Сперматозоиды получали из эпидидимисов девяти взрослых беспородных домашних котов, как описано ранее (Brusentsev et al., 2018). Вкратце, каудальные части эпидидимисов извлекали, перенесли на чашку Петри и измельчали в одном мл среды "Collect", подогретой до 37°C. Раствор со сперматозоидами дважды центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин в среде "Collect" и удаляли супернатант. Осадок смешивали с минимальным (5–10 мкл) количеством оставшегося супернатанта и сверху добавляли 200 мкл среды "Collect". Пробирку помещали в CO₂-инкубатор на 30 мин для всплытия сперматозоидов в верхний слой раствора, а затем их собирали и использовали для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Концентрацию сперматозоидов и их подвижность оценивали в счетной камере Маклера (Merck, Германия). Оплодотворение проводили в среде для культивирования: 25 мл Ham's F-10 (Merck, Германия) в концентрации 9.8 г/л с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Fetal Calf Serum) – FCS (Thermo fisher scientific, США) и 50 мкг/мл гентамицина. Созревшие ооциты переносили в 4-луночный планшет со средой для культивирования (по 500 мкл на лунку) предварительно выдержанной в атмосфере 5% CO₂ в

течение не менее двух часов. Сверху среда была покрыта 400 мкл минерального масла FertiCult (FertiPro, Бельгия). В чашку с 10–20 ооцитами на лунку объемом 500 мкл добавляли 8 мкл суспензии сперматозоидов с конечной концентрацией 1×10^6 подвижных сперматозоидов/мл. Гаметы совместно инкубировали в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C, 5% CO₂ и влажности 90% в течение 24 ч. Средний процент дробления *in vitro* составил 38.8%, который оценивали, как число 2-клеточных эмбрионов, развившихся из оплодотворенных зрелых ооцитов через 24 ч после ЭКО.

Приготовление раствора линолевой кислоты

Раствор ЛК готовили по протоколу (Aardema et al., 2011). Вкратце, 3.21 мл водного раствора 10 мМ гидроксида калия (Merck, Германия) смешивали с 19 мкл ЛК (Merck, Германия) при 70°C в течение 30 мин с получением 20 мМ раствора линолеата калия. Затем раствор инкубировали с 3.3 мМ БСА без жирных кислот (BSA Fatty Acid-free; Merck, Германия) с получением 10 мМ раствора ЛК-БСА в соотношении 3 : 1. Приготовленный раствор добавляли в среду для культивирования *in vitro* эмбрионов до конечной концентрации 400 мкМ.

Воздействие линолевой кислоты на эмбрионы in vitro и дизайн эксперимента

Дизайн эксперимента представлен графически на рис. 1. Двухклеточные эмбрионы домашней кошки, полученные в результате ЭКО, были разделены на две группы: контрольную и группу, которую культивировали с добавлением линолевой кислоты – группа ЛК. Эмбрионы контрольной группы культивировали в течение 66 ч в 20 мкл среды Ham's F-10 с добавлением 5% FCS и 50 мкг/мл гентамицина. Эмбрионы из группы ЛК культивировали в течение того же времени и в той же среде, но с добавлением 400 мкМ ЛК, связанной с БСА. После культивирования некоторые из преимплантационных зародышей анализировали при помощи Рамановской спектроскопии для оценки степени ненасыщенности внутриклеточных липидов. Другие зародыши фиксировали в 400 мкл 4%-го формальдегида на фосфатно-солевом буферном растворе – PBS (Росмедбио, Россия) при рН 7.4–7.6 для дальнейшей оценки числа клеток и уровня фрагментации ядер (после окраски DAPI и флуоресцентной микроскопии) либо для оценки общего уровня внутриклеточных липидов (после окраски нильским красным и конфокальной микроскопии). Остальные эмбрионы замораживали, оттаивали и культивировали *in vitro* в течение 30 ч, а затем оценивали стадию развития при помощи световой микроскопии, фиксировали, как описано выше и производили оценку числа

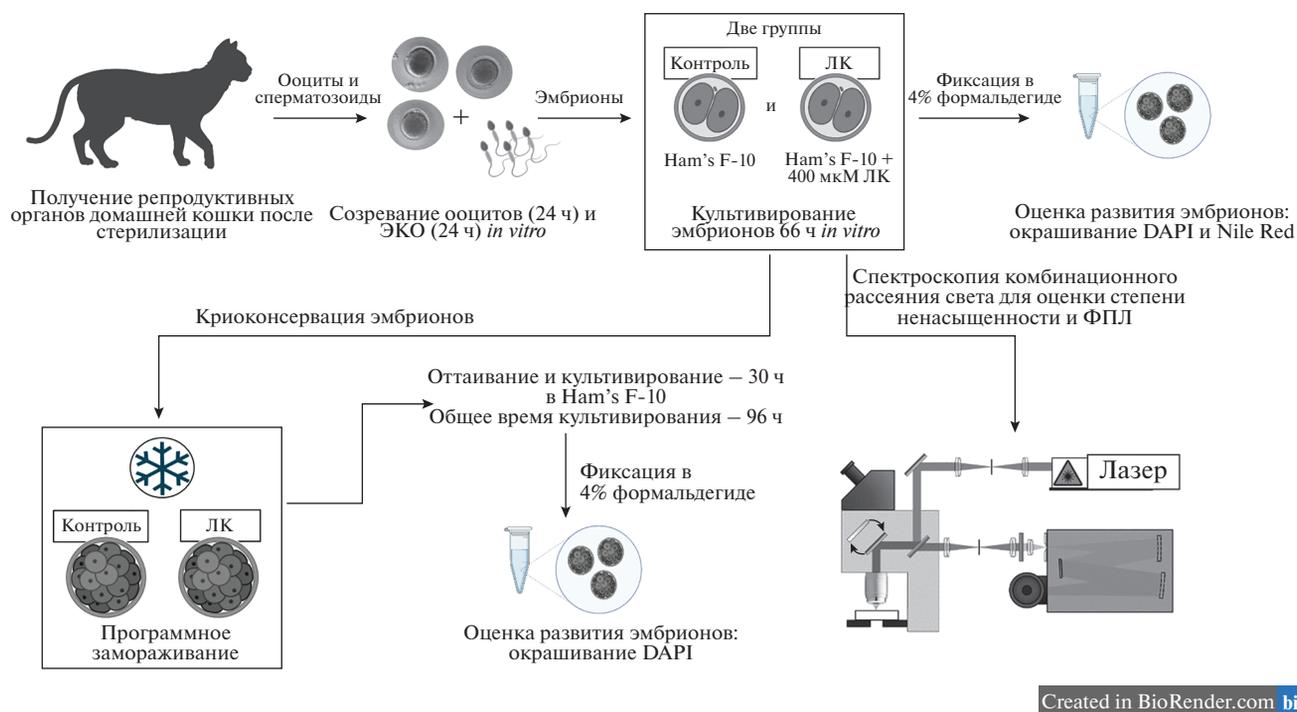


Рис. 1. Дизайн эксперимента. Используемые сокращения: ЛК – линолевая кислота, ФПЛ – фазовый переход липидов, ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение.

клеток и уровня фрагментации ядер после окрашивания DAPI и флуоресцентной микроскопии. Общее время культивирования *in vitro* эмбрионов, подвергавшихся замораживанию, на момент фиксации составило 96 ч.

Криоконсервация эмбрионов

Эмбрионы замораживали по протоколу Гомец с соавт. (2003) с модификациями (Gomez et al., 2003). Раствор криопротектора содержал 0.125 М сахарозы (Merck, Германия), 10% пропиленгликоля – ПГ (Merck, Германия) на среде “Collect” с добавлением 10% FCS. Эмбрионы обеих групп (контрольной и группы ЛК) выдерживали в криопротекторной смеси, разбавленной средой “Collect” в соотношении 1 : 2, а затем 2 : 1, по три минуты в каждой; после этого переносили в неразбавленный раствор криопротектора (10% ПГ и 0.125 М сахарозы) на 15 мин при комнатной температуре и помещали в пластиковую соломинку объемом 0.25 мл (Cryo Bio System, Франция), заполненную раствором для замораживания (три сектора, разделенные пузырьками воздуха); зародыши помещали в средний сектор. Соломинку с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Австралия) при 20°C, и охлаждали со скоростью 2°C/мин до –6°C, а затем выдерживали при этой температуре 10 мин. В течение этого 10-минутного периода вручную инициировали нуклеацию льда, прикасаясь к со-

ломине предварительно охлажденным пинцетом к верхнему мениску первого и второго секторов. Затем возобновляли охлаждение со скоростью 0.3°C/мин до –30°C и выдерживали при этой температуре в течение 10 мин. После этого соломинку погружали в жидкий азот (LN₂). Для оттаивания соломинку извлекали из LN₂ и выдерживали на воздухе при комнатной температуре в течение двух минут, как было рекомендовано ранее для данного протокола криоконсервации (Gomez et al., 2003). Эмбрионы отмывали от криопротектора путем переноса между каплями растворов с различной концентрацией ПГ/сахарозы на основе среды “Collect” (0.95 М/0.25 М; 0.95 М/0.125 М; 0.45 М/0.125 М; 0 М/0.125 М; 0 М/0.0625 М) по 3 мин в каждой капле. Затем их переносили в среду для культивирования *in vitro* на 30 ч. После этого эмбрионы фиксировали и оценивали путем окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией, как описано ниже.

Окрашивание DAPI и флуоресцентная микроскопия

Фиксированные эмбрионы трижды отмывали от формальдегида при комнатной температуре в PBS с добавлением 1 мг/мл поливинилпирролидона – ПВП (Merck, Германия) в течение 5 мин, а затем инкубировали с 2 мг/мл DAPI для окрашивания ядер. После этого их снова промывали таким же образом и помещали на предметные стекла.

Образцы оценивали с помощью микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия), с фильтром, подходящим для окрашивания DAPI, цифровой камеры AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия) и программы ImageJ (НИН, США).

Для каждого эмбриона подсчитывали как общее число ядер, так и отдельно число интерфазных ядер и число фрагментированных ядер. Индекс фрагментации оценивали, как процент ядерных фрагментов к общему числу ядер. По общему числу ядер (Mokrousova et al., 2020b) преимплантационные зародыши классифицировали как остановившиеся в развитии (менее 8 ядер), на стадии дробления (9–16 ядер), морулы (17–50 ядер) и бластоцисты (более 50 ядер).

Окрашивание нильским красным и конфокальная микроскопия

Оценку интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов контрольных и культивированных в течение 66 ч с ЛК эмбрионов проводили с помощью окрашивания нильским красным – Nile Red (Merck, Германия), как описано ранее (Romek et al., 2011). Вкратце, фиксированные эмбрионы трижды отмывали от формальдегида в PBS, содержащем 1 мг/мл ПВП, по 5 мин в каждой капле при комнатной температуре и инкубировали в растворе нильского красного с концентрацией 10 мкг/мл в течение трех часов при 37°C для достижения максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot et al., 2005). Образцы помещали на предметные стекла в PBS. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия). Эмбрионы, окрашенные нильским красным, облучали газовым аргоновым лазером (максимальная мощность 30 мВт) при 0.1% от максимальной мощности на длине волны 488 нм. Спектры получали в диапазоне длин волн 494–687 нм с шагом 9 нм. Все изображения были получены в режиме подсчета фотонов – “photon counting”. Суммирование оптических срезов и вычитание фоновой флуоресценции выполняли с помощью программы ImageJ. Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckp-tabo>).

Спектроскопия комбинационного рассеяния света

Изменение степени ненасыщенности липидов и температуру начала ФПЛ в эмбрионах домашней кошки изучали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света.

Экспериментальная установка

Спектроскопию комбинационного рассеяния света проводили на экспериментальной установке, состоящей из прямого микроскопа Orthoplan (Leitz, Германия), оснащенного сканирующим пьезопозиционером PXY-200 (Newport, США) и монохроматора SP2500i (Princeton Instruments, США), снабженным зарядным устройством, сопряженным с инструментальным детектором Spec-10:2K/LN (Princeton Instruments, США). Оптический криостат THMS350V (Linkam, Великобритания) использовали для проведения измерений спектров при различных температурах. Источником монохроматического излучения для возбуждения комбинационного рассеяния света служил твердотельный лазер Excelsior (Spectra-Physics, США) с длиной волны 532.1 нм. Лазерный луч фокусировали в пятно диаметром ~1 мкм с помощью объектива $\times 60$ CFI Plan Fluor 60XC (Nikon Instruments, Япония) с числовой апертурой 0.85. Мощность излучения после объектива составляла 20 мВт. Спектральное разрешение составляло 2.5 см⁻¹. Длины волн всех измеренных спектров калибровали с помощью неоновой газоразрядной лампы. Спектры комбинационного рассеяния света измерялись в диапазоне от 800 до 3200 см⁻¹.

Оценка степени ненасыщенности внутриклеточных липидов

Пять контрольных и шесть эмбрионов группы ЛК, культивированных в течение 66 ч, исследовали при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света. Для изучения степени ненасыщенности липидов в эмбрионах было измерено 100 спектров комбинационного рассеяния от разных случайно выбранных локальных областей внутри эмбрионов. Для выделения спектрального вклада липидов использовался метод главных компонент. Поскольку наиболее интенсивный сигнал комбинационного рассеяния исходит от липидных гранул, мы предполагаем, что полученная спектральная составляющая липидов в основном связана именно с ними. Метод выделения вклада липидов в спектры комбинационного рассеяния света был описан нами в работе Игониной и соавторов (2021) ранее (Igonina et al., 2021). Вкратце, чтобы извлечь вклад липидов, мы уменьшили размерность данных до трех главных компонент, связанных с вариацией в спектрах трех основных типов соединений: липидов, белков и воды, которые дают наиболее интенсивный вклад в измеряемые спектры. Затем подбирали такую линейную комбинацию этих компонент, чтобы результирующий спектр был свободен от пика фенилаланина при 1004 см⁻¹ и полосы валентных колебаний ОН воды на частотах выше

Таблица 1. Влияние добавления линолевой кислоты при культивировании *in vitro* на стадию развития эмбрионов домашней кошки и фрагментацию ядер до криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	контроль	ЛК
Число эмбрионов	39	43
Не развивающиеся, %	1 (2.6)	4 (9.3)
Дробящиеся, %	6 (15.4)	5 (11.6)
Морулы, %	24 (61.5)	28 (65.1)
Бластоцисты, %	8 (20.5)	6 (14.0)
Индекс фрагментации ²	2.0 [0;4.2]	2.6 [0;6.1]

¹ Общее число использованных самок – 47. Число повторов – 9. Все эмбрионы были распределены между группами случайным образом.

² Число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 32 и 34 для контроля и ЛК соответственно.

3050 см⁻¹. Поскольку в спектре комбинационного рассеяния света липидов отсутствуют линии на этих частотах, полученная комбинация главных компонент будет отражать липидный вклад в измеряемые спектры. Для оценки степени ненасыщенности липидов использовали соотношение интенсивностей линии валентных колебаний связей С=C при 1657 см⁻¹ к линии ножничных деформационных колебаний СН₂ (δ СН). Интенсивность первой линии увеличивается с увеличением концентрации двойных связей С=C, интенсивность второй линии увеличивается с увеличением числа метиленовых групп. Для характеристики ненасыщенности мы использовали спектры комбинационного рассеяния, измеренные при $T = 25^\circ\text{C}$.

Измерение температуры начала фазового перехода липидов при охлаждении эмбрионов

Для изучения зависимости фазового состояния липидов от температуры эмбрионы помещали в раствор EmbryoMax KSOM (Merck, Германия) с добавлением 0.2 М сахарозы и 1.5 М ПГ. Охлаждение эмбрионов проводили сходным образом, как описано выше для основного эксперимента (см раздел “Криоконсервация эмбрионов”). В начале эмбрионы охлаждали до -7°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, затем вручную инициировали нуклеацию льда, и образец выдерживали в течение 10-минут при данной фиксированной температуре для перекристаллизации льда. После этого образец охлаждали со скоростью $0.3^\circ\text{C}/\text{мин}$. В процессе охлаждения делали дополнительные паузы ~ 20 мин для измерения спектров комбинационного рассеяния. Температуру на нужном уровне поддерживали при помощи криостата. Изменение фазового состояния липидов отслеживали по соотноше-

нию интенсивностей антисимметричных (aСН) и симметричных (sСН) валентных колебаний СН₂ на 2880 и 2850 см⁻¹ соответственно. Эта особенность в спектрах комбинационного рассеяния отражает изменение конформационного состояния липидов, происходящее при фазовом переходе. Из-за сложного состава внутриклеточных липидов ФПЛ в клетках происходит не при одной конкретной температуре, а в некотором температурном диапазоне. Поэтому мы отслеживали T^* при которой появляется пик aСН (Okotrub et al., 2018). Предварительная обработка данных включала коррекцию всплесков интенсивности в измеренных спектрах и интерполяцию фона линейной функции. Спектры анализировали и обрабатывали, как описано ранее (Okotrub et al., 2018; Igonina et al., 2021).

Статистика

Данные проверяли на нормальное распределение с помощью критерия Шапиро–Уилка и анализировали с помощью программы STATISTICA v 8.0 StatSoft, Inc. Данные с нормальным распределением сравнивали по t -критерию Стьюдента, в противном случае использовали U -критерий Манна–Уитни. Процент эмбрионов на разных стадиях развития до и после замораживания сравнивали с помощью критерия Хи-квадрат. Данные по фрагментации ядер представлены в виде медианы и 25–75% квартилей – Me [Q1; Q3] и сравнены по U -критерию Манна–Уитни. Число клеток в морулах и бластоцистах до и после криоконсервации, интенсивность флуоресценции липидов (подсчет фотонов), а также степени ненасыщенности липидов и T^* представлены, как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Различия по этим параметрам между группами сравнивали с помощью t -критерия Стьюдента. Различия при $p < 0.05$ считали статистически достоверными (k – число степеней свободы).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Развитие эмбрионов in vitro после воздействия линолевой кислоты

Добавление в культуральную среду ЛК в дозе 400 мкМ не влияло ни на развитие эмбрионов, ни на фрагментацию их ядер (табл. 1). Достоверных различий между группой ЛК и контролем по числу ядер через 66 ч культивирования выявлено не было (табл. 2, рис. 2).

Анализ степени ненасыщенности и фазового перехода липидов

Среднее отношение интенсивностей $I_{\text{C=C}}/I_{\delta\text{СН}} = 0.96 \pm 0.03$ для эмбрионов, культивируемых без

Таблица 2. Влияние добавления линолевой кислоты при культивировании *in vitro* на число ядер эмбрионов кошки до и после криоконсервации

Группа	Число ядер до криоконсервации, культивирование <i>in vitro</i> – 66 ч					
	морулы			бластоцисты		
	число эмбрионов	общее число ядер	интерфазные ядра	число эмбрионов	общее число ядер	интерфазные ядра
Контроль	24	36.0 ± 2.2	31.7 ± 1.6	8	61.0 ± 2.9	58.5 ± 2.8
ЛК	28	32.3 ± 2.2	27.4 ± 1.7	6	65.8 ± 6.2	62.0 ± 5.2

Число ядер после криоконсервации и последующего (30 ч) культивирования <i>in vitro</i> Общее время культивирования до и после криоконсервации – 96 ч						
Контроль	21	36.8 ± 2.9	33.9 ± 2.6	11	76.8 ± 10.6	62.6 ± 5.4
ЛК	21	27.7 ± 2.7*	25.7 ± 1.7 ⁺	16	96.0 ± 12.3	91.8 ± 10.7 [#]

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем ($t = 2.275$). Число степеней свободы (k) – 40.

⁺ $p < 0.05$ по сравнению с контролем ($t = 2.612$). Число степеней свободы (k) – 40.

[#] $p < 0.05$ по сравнению с контролем ($t = 2.130$). Число степеней свободы (k) – 25.

ЛК, а $T^* = 1.6 \pm 0.8^\circ\text{C}$ (рис. 3). Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду вызывало достоверное увеличение ($k = 9$; $t = 3.333$; $p < 0.01$) степени ненасыщенности (среднее $I_{C=C}/I_{\delta\text{CH}} = 1.08 \pm 0.02$), а также достоверное снижение

($k = 9$; $t = 3.611$; $p < 0.01$) температуры начала фазового перехода липидов до $T^* = -3.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$. Таким образом, воздействие ЛК на эмбрион значительно повышало степень ненасыщенности липидов и существенно снижало T^* .

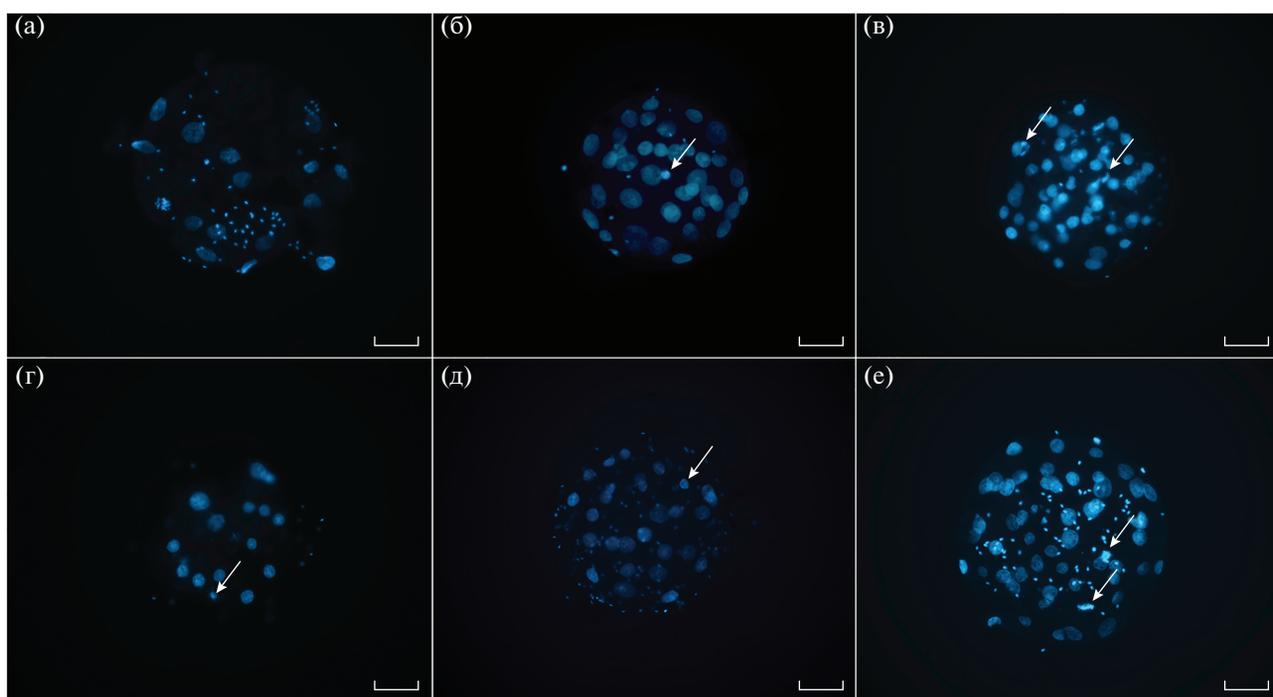


Рис. 2. Стадии развития эмбриона после культивирования *in vitro* в течение 66 ч без (а, б, в) и с добавлением линолевой кислоты (г, д, е): стадии дробления (а, г), морулы (б, д), бластоцисты (в, д). Окрашивание DAPI. Белые стрелки – фрагментированные ядра. Масштаб – 50 мкм.

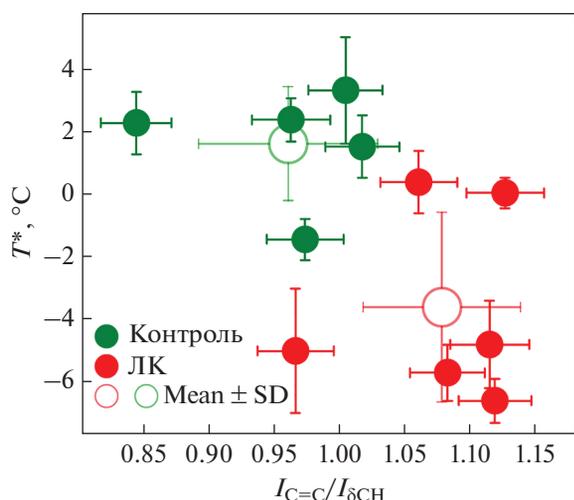


Рис. 3. Степень ненасыщенности липидов и T^* в blastомерах эмбрионов домашней кошки. Степень ненасыщенности липидов после культивирования *in vitro* эмбрионов домашней кошки с линолевой кислотой достоверно больше ($t = 3.333$; $p < 0.01$) по сравнению с контролем. Число степеней свободы (k) – 9. Температура начала фазового перехода липидов после культивирования *in vitro* эмбрионов домашней кошки с линолевой кислотой достоверно ниже ($t = 3.611$; $p < 0.01$) по сравнению с контролем. Число степеней свободы (k) – 9.

Оценка общего содержания внутриклеточных липидов

Добавление в среду 400 мкМ ЛК и культивирование в течение 66 ч не влияло на общее количество липидов в эмбрионах кошек. Интенсивность флуоресценции, измеренная по числу фотонов, в контроле – у эмбрионов, культивированных без добавления кислоты ($18.08 \times 10^6 \pm 1.38 \times 10^6$) и в

Таблица 3. Влияние добавления линолевой кислоты при культивировании *in vitro* на стадию развития эмбрионов домашней кошки и фрагментацию ядер после криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	контроль	ЛК
Число эмбрионов	36	43
Не развивающиеся, %	3 (8.3)	4 (9.3)
Дробящиеся, %	1 (2.8)	2 (4.7)
Морулы, %	21 (58.3)	21 (48.8)
Бластоцисты, %	11 (30.6)	16 (37.2)
Индекс фрагментации ²	6.0 [3.1;11.7]	4.5 [2.0;7.7]

¹ Общее число использованных самок – 47. Число повторов – 9. Все эмбрионы были распределены между группами случайным образом.

² Число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 32 и 37 для контроля и ЛК соответственно.

группе ЛК ($16.92 \times 10^6 \pm 0.97 \times 10^6$), не отличалась (рис. 4).

Жизнеспособность эмбрионов после криоконсервации

Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду не влияло на долю эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития после оттаивания с последующим культивированием *in vitro* в течение 30 ч (табл. 3). В полученных таким образом морулах было меньше общее число ядер ($k = 40$; $t = 2.275$; $p < 0.05$), а также интерфазных ядер ($k = 40$; $t = 2.612$; $p < 0.05$) после воздействия ЛК при культивировании *in vitro* по сравнению с контролем (табл. 2). В бластоцистах ЛК группы, напротив, было обнаружено большее число интерфазных ядер ($k = 25$; $t = 2.130$; $p < 0.05$) по сравнению с контролем (табл. 2, рис. 5). Индекс фрагментации не отличался между группами после криоконсервации (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании степень ненасыщенности внутриклеточных липидов в полученных путем ЭКО эмбрионах кошек возрастала после воздействия на них ЛК *in vitro*. Наши данные хорошо согласуются с более ранним наблюдением, в котором сообщалось об аналогичном увеличении уровня ненасыщенности внутриклеточных липидов у эмбрионов мышей, культивированных с ЛК (Igonina et al., 2021).

В работах, проведенных на эмбрионах крупного рогатого скота и эмбрионах мышей, культивируемых *in vitro* с ЛК или конъюгированной линолевой кислотой (КЛК), оценивали общее содержание липидов, которое либо изменялось, либо оставалось на прежнем уровне в зависимости от используемой дозы (Accorsi et al., 2016; Carvalho et al., 2019; Dias et al., 2020; Igonina et al., 2021). В частности, в упомянутом выше исследовании Игоониной с соавт. (2021) общее количество внутриклеточных липидов возрастало у эмбрионов мышей после воздействия на них ЛК при культивировании *in vitro*, однако в настоящем исследовании на эмбрионах кошек изменений общего количества внутриклеточных липидов выявлено не было. Мы предполагаем, что это может быть результатом изначально высокого содержания липидов в преимплантационных зародышах кошек. Кроме того, непрозрачность эмбрионов, связанная с интенсивным рассеянием света на ЛГ, затрудняет объемную интеграцию флуоресцентного сигнала для эмбрионов кошек, в отличие от гораздо более прозрачных эмбрионов мышей, которые содержат меньше внутриклеточных липидов (Igonina et al., 2021). В нашей работе метод оценки общего содержания липидов в преимплантационных эм-

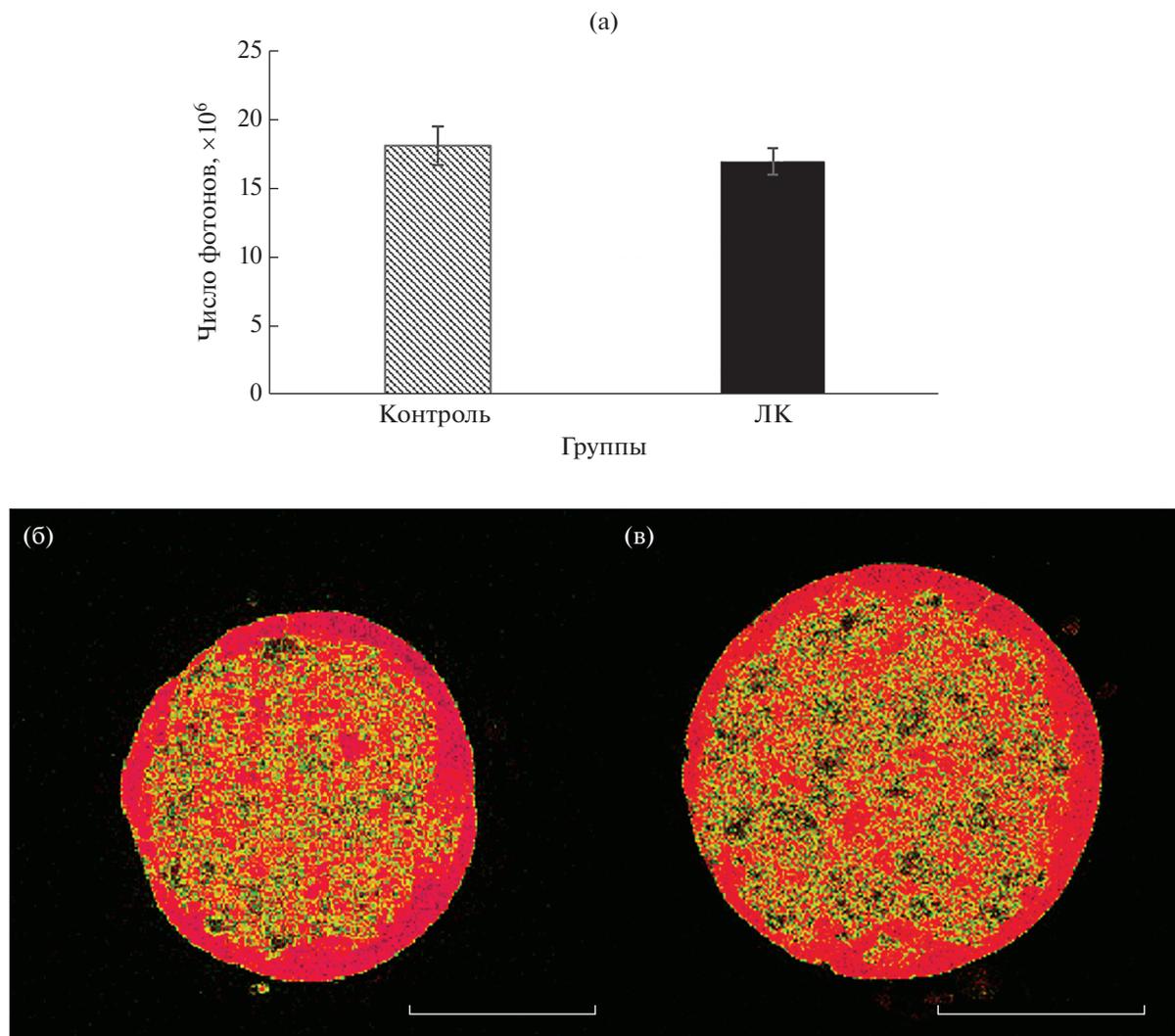


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции нильского красного после 66 часов культивирования *in vitro* эмбрионов без и с линолевой кислотой. (а) Средняя интенсивность $M \pm SEM$; (б, в) репрезентативные оптические срезы КЛСМ эмбрионов кошек, окрашенных нильским красным. (б) Без ЛК; (в) с ЛК. Цвет соответствует длинам доминирующих волн. Масштаб – 50 мкм.

брионах путем окраски их флуорохромом нильским красным и последующей конфокальной микроскопии был впервые применен в отношении кошачьих. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в отличие от эмбрионов мышей, в отношении которых применение данного подхода является достаточно эффективным для определения влияния ЛК на ЛГ (Igonina et al., 2021), для преимплантационных зародышей кошек, которые богаты внутриклеточными липидами (Amstislavsky et al., 2019), этот метод не позволил обнаружить изменения общего содержания липидов и нуждается в существенной модификации. Мы полагаем, что увеличение степени ненасыщенности липидов в эмбрионах после воздействия ЛК, наблюдаемое в настоящем исследовании на кошках и предыдущей работе на мышах (Igonina et al., 2021), важно

само по себе и эти изменения могут являться причиной изменения криобиологических характеристик эмбрионов, имевшего место в обоих случаях.

В принципе, добавление жирных кислот при культивировании преимплантационных эмбрионов не обязательно должно приводить к сдвигу температуры начала фазового перехода, но также может сопровождаться разделением липидов на фракции с высокой и низкой температурой плавления, кроме того, после оттаивания часть насыщенных липидов может оставаться в упорядоченной фазе, что возможно оказывает негативный эффект на жизнеспособность клетки (Okotrub et al., 2021). Мы предполагаем, что добавления ЛК может быть достаточным для снижения T^* за счет увеличения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, как это наблюдалось в нашем

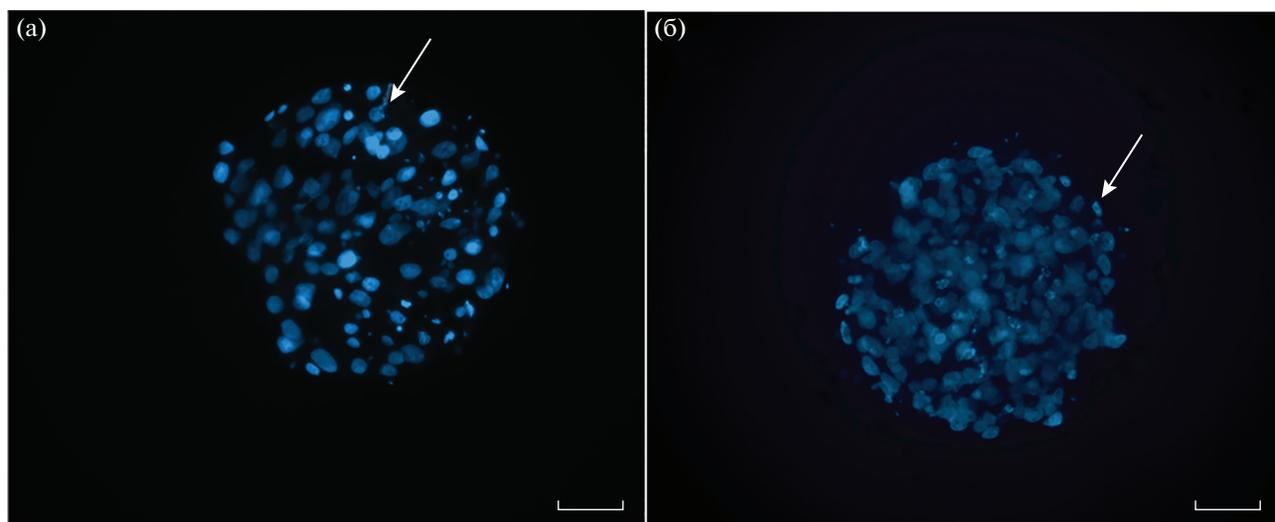


Рис. 5. Развитие бластоцист после криоконсервации и культивирования *in vitro* в течение 30 ч: контроль (а) и с добавлением ЛК (б). Белые стрелки – фрагментированные ядра. Масштаб – 50 мкм.

эксперименте. В нашей предыдущей работе (Igonina et al., 2021) мышинные эмбрионы, после воздействия ЛК, имели почти двукратное увеличение степени ненасыщенности. Для кошачьих эмбрионов из-за их высокого содержания жиров и в целом высокой степени их ненасыщенности мы наблюдаем только ~10% увеличение удельного числа двойных связей в липидах. Однако эффект снижения T^* оказался сопоставимым: $-8 (\pm 2)^\circ\text{C}$ для мышей и $-5 (\pm 2)^\circ\text{C}$ для эмбрионов кошек.

Наши результаты показывают, что в результате воздействия ЛК в ходе культивирования *in vitro* наблюдается большее число клеток в развивающихся бластоцистах кошек после процедур замораживания-оттаивания, что может свидетельствовать о переходе морул на более продвинутой стадии развития именно в группе ЛК. Подобные положительные эффекты ЛК или КЛК на развитие эмбрионов после криоконсервации были продемонстрированы на крупном рогатом скоте (Pereira et al., 2007; Accorsi et al., 2016). В частности, криоконсервированные эмбрионы крупного рогатого скота, после воздействия ЛК, восстанавливались быстрее, чем контрольные (Pereira et al., 2007), хотя, как показали позднее, этот эффект был временным (Accorsi et al., 2016). Точно так же эмбрионы крупного рогатого скота, после добавления 100 мкМ КЛК в культуральную среду, демонстрировали более высокую скорость реэспандирования бластоцист после криоконсервации по сравнению с контролем, однако этот эффект нивелировался с увеличением времени воздействия (Dias et al., 2020).

На основе анализа литературы, нами ранее была выдвинута гипотеза о том, что не только общее количество внутриклеточных липидов, но и степень их ненасыщенности может влиять на крио-

биологические характеристики ооцитов и эмбрионов млекопитающих (Amstislavsky et al., 2019). Мы предположили, что наличие более насыщенных жиров в клетках повышает температуру начала фазового перехода липидов, и, соответственно, криоконсервация, с большей вероятностью, приводит к разрушению замораживаемого образца. С другой стороны, чем более ненасыщены внутриклеточные липиды, тем ниже температура начала фазового перехода липидов, и соответственно, возрастает толерантность к низким температурам у клеток. Результаты недавнего исследования на мышцах подтвердили нашу гипотезу в том, что при культивировании эмбрионов *in vitro* с ЛК степень ненасыщенности внутриклеточных липидов возрастает и это сопровождается снижением температуры начала ФПЛ, однако, при этом, не было отмечено каких-либо признаков изменения криорезистентности эмбрионов (Igonina et al., 2021). Следует отметить, что эмбрионы мышей содержат мало липидов и эти внутриклеточные липиды не играют столь значимой роли в преимплантационном развитии мышей, какую они имеют у видов млекопитающих, ооциты и эмбрионы которых богаты внутриклеточными жирами (Bradley, Swann, 2019). Таким образом, гипотезу необходимо было проверить на другом виде животных, ооциты и эмбрионы которых богаты внутриклеточными липидами, к таким, в частности, относится домашняя кошка. Результаты настоящего исследования подтверждают нашу гипотезу, поскольку воздействие ненасыщенной ЛК при культивировании *in vitro* эмбрионов домашней кошки привело к повышению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и снижению температуры начала ФПЛ. При этом имело место возрастание числа клеток в бластоцистах, полученных после

культивирования тех замороженно-оттаянных эмбрионов, которые подвергались воздействию ЛК до криоконсервации. Это свидетельствует о том, что возрастание степени ненасыщенности внутриклеточных липидов может отражаться на устойчивости к криоконсервации эмбрионов домашней кошки посредством влияния на температуру начала ФПЛ.

Исторически считали, что липидные гранулы в клетках животных являются исключительно хранилищем нейтральных липидов, но в последние два десятилетия их роль существенно пересмотрена и им посвящено большое число исследований различных групп (Welte, Gould, 2017; Herker et al., 2021; Ibayashi et al., 2021). Наряду с функцией сохранения энергетического субстрата, показана роль ЛГ во внутриклеточном метаболизме липидов (Athenstaedt, Daum, 2006), в частности, в их биосинтезе (Kuerschner et al., 2008), они способны удерживать некоторые токсичные липофильные молекулы, обеспечивая детоксикацию клетки (Welte, Gould, 2017), принимать участие в экспрессии генов, запасании белка, борьбе с некоторыми вирусными инфекциями и поддержании гомеостаза (Herker et al., 2021; Ibayashi et al., 2021). Развитие микроскопических и спектроскопических методов способствовало этим исследованиям и возрастающему интересу фундаментальной науки к внутриклеточным ЛГ, в том числе и в ходе созревания ооцитов и развития преимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих (Брусенцев и др., 2019; Ibayashi et al., 2021; Arena et al., 2021). В результате нашей работы показана принципиальная возможность влиять на криобиологические характеристики полученных *in vitro* эмбрионов кошек путем изменения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов в результате их культивирования *in vitro* с ненасыщенной жирной кислотой. Этот результат важен как для эмбриологии, так и фундаментальной криобиологии. Кроме того, этот результат, полученный на эмбрионах домашних кошек может иметь значение и для сохранения исчезающих представителей кошачьих, поскольку многие представители этого семейства находятся под угрозой (Найденко, 2019), а репродуктивные технологии, такие как ЭКО и криоконсервация гамет и эмбрионов являются важными современными инструментами сохранения генетических ресурсов диких видов кошачьих (Амстиславский и др., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты подтверждают гипотезу о том, что качественный состав внутриклеточных липидов, в частности, повышение степени их ненасыщенности благодаря воздействию ЛК в процессе культивирования *in vitro*, влияет на криобиологиче-

ские характеристики преимплантационных эмбрионов домашней кошки, вызывая, в частности, понижение температуры начала ФПЛ. Воздействие ЛК при культивировании *in vitro* эмбрионов кошек увеличивало степень ненасыщенности внутриклеточных липидов примерно на 10%, но не влияло на общее их количество. Эти изменения привели к снижению температуры начала ФПЛ на 5°C и более высоким темпам последующего развития *in vitro* эмбрионов после оттаивания. Таким образом, снижение температуры начала ФПЛ эмбрионов домашних кошек, после воздействия на них ЛК в ходе культивирования *in vitro*, может приводить к увеличению их криоустойчивости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность инженерам ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” (<http://spf.bionet.nsc.ru>) и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy>), а также ЦКП “Высокоразрешающей спектроскопии газов и конденсированных сред” ИАиЭ СО РАН (<https://www.iae.nsk.su/ru/collab-center>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-34-90093, бюджетного проекта № FWNR-2022-0023 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Часть работы поддержана государственным заданием № 121032400052-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы С.Я. Амстиславский, Е.Ю. Брусенцев, С.В. Окотруб, К.А. Окотруб разработали дизайн эксперимента. Автор С.Я. Амстиславский координировал все работы, связанные с данным исследованием. Авторы С.В. Окотруб и Д.А. Лебедева получали преимплантационные эмбрионы домашней кошки, проводили их криоконсервацию, культивирование *in vitro*, фиксацию и подсчет ядер клеток при окрашивании DAPI.

Автор К.А. Окотруб проводил измерение спектров комбинационного рассеяния света в эмбрионах и их интерпретацию. Авторы Э.А. Чуйко и Т.А. Рахманова проводили окрашивание эмбрионов нильским красным с последующей конфокальной микроскопией для оценки общего количества липидов. Авторы Е.Ю. Брусенцев и С.Я. Амстиславский участвовали в обработке данных. Авторы С.Я. Амстиславский, С.В. Окотруб, Е.Ю. Брусенцев, К.А. Окотруб и Т.А. Рахманова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Мокроусова В.И., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Напимеров В.А. Применение концепции криобанка по отношению к диким и исчезающим видам отряда хищных (Carnivora) // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 5. С. 345–366.
- Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Амстиславский С.Я. Роль липидных гранул в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 5. С. 297–305.
- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Окотруб С.В., Чуйко Э.А., Амстиславский С.Я. Влияние линолевой кислоты на эффективность витрификации эмбрионов мышей // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 1. С. 58–62.
- Найденко С.В. Биология размножения кошачьих: механизмы повышения репродуктивного успеха. Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук. М.: КМК, 2019. 191 с.
- Aardema H., Vos P., Lolicato F., et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence // Biol. Reprod. 2011. V. 85. P. 62–69.
- Accorsi M., Leao B., Rocha-Frigoni N., Perri S., Mingoti G. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured *in vitro* with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance // Zygote. 2016. V. 24. P. 485–494.
- Amini E., Asadpour R., Roshangar L., Jafari-Joozani R. Effect of linoleic acid supplementation on *in vitro* maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine // Int. J. Reprod. Biomed. 2016. V. 14. P. 255–262.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // Reprod. Dom. Anim. 2012. V. 47. P. 164–175.
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // Biopreserv. Biobanking. 2019. V. 17. P. 76–83.
- Arena R., Bisogno S., Gasior L., et al. Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. e2018362118.
- Athenstaedt K., Daum G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation // Cell. Mol. Life Sci. 2006. V. 63. № 12. P. 1355–1369.
- Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos // Int. J. Dev. Biol. 2019. V. 63. P. 93–103.
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Rozhkova I., Amstislavsky S. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // Theriogenology. 2018. V. 110. P. 148–152.
- Carvalho B., Costa F., Detoni D., Rosa F., Dias A. Use of conjugated linoleic acid (*trans* 10, *cis* 12) to cultivate bovine embryos: effect on cryoresistance and lipid content // Rev. Bras. Zoot. 2019. V. 48. e20180322.
- Crichton E., Bedows E., Miller-Lindholm A. et al. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 105–113.
- Dias L., Leme L., Spricigo J., Pivato I., Dode M. Effect of delipidant agents during *in vitro* culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos // Reprod. Dom. Anim. 2020. V. 55. P. 11–20.
- Fayez S., Leroy J., Ghaffari Novin M., Darabi M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development // Zygote. 2018. V. 26. P. 1–13.
- Genicot G., Leroy J., Van Soom A., Donnay I. The use of a fluorescent dye Nile red to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // Theriogenology. 2005. V. 63. P. 1181–1194.
- Gomez M., Pope E., Harris R., Mikota S., Dresser B. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer // Theriogenology. 2003. V. 60. P. 239–251.
- Herker E., Vieyres G., Beller M., Krahrer N., Bohnert M. Lipid droplet contact sites in health and disease // Trends. Cell. Biol. 2021. V. 31. P. 345–358.
- Ibayashi M., Aizawa R., Mitsui J., Tsukamoto S. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos // Reproduction. 2021. V. 162. R99–R109.
- Idrissi S., Bourhis D., Lefevre A. et al. Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile // Biol. Reprod. 2021a. ioab198.
- Idrissi S., Bourhis D., Lefevre A. et al. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process // Sci. Rep. 2021b. V. 11. P. 11618.
- Igonina T., Okotrub K., Brusentsev E. et al. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after *in vitro* culture with linoleic acid // Cryobiology. 2021. V. 99. P. 55–63.
- Jewgenow K., Zahmel J. Preservation of female genetic resources in feline species // Theriogenology. 2020. V. 156. P. 124–129.
- Karasahin T. The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification // Pol. J. Vet. Sci. V. 22. P. 661–666.
- Kuerschner L., Moessinger C., Thiele C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets // Traffic. 2008. V. 9. № 3. P. 338–352.

- Mazur P. Equilibrium, quasiequilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophys.* 1990. V. 17. P. 53–92.
- Mokrousova V., Okotrub K., Brusentsev E., Kizilova E., Surovtsev N., Amstislavsky S. Effects of slow freezing and vitrification on embryo development in domestic cat // *Reprod. Dom. Anim.* 2020a. V. 55. P. 1328–1336.
- Mokrousova V., Okotrub K., Amstislavsky S., Surovtsev N. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // *Cryobiology.* 2020b. V. 95. P. 177–182.
- Okotrub K., Mokrousova V., Amstislavsky S., Surovtsev N. Lipid droplet phase transition in freezing cat embryos and oocytes probed by Raman spectroscopy // *Biophys. J.* 2018. V. 115. P. 577–587.
- Okotrub K., Okotrub S., Mokrousova V., Amstislavsky S., Surovtsev N. Lipid phase transitions in cat oocytes supplemented with deuterated fatty acids // *Biophys. J.* 2021. V. 120. P. 5619–5630.
- Pereira R., Baptista M., Vasques M. et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA) // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 98. P. 293–301.
- Pereira R., Marques C. Animal oocyte and embryo cryopreservation // *Cell. Tissue. Bank.* 2008. V. 9. P. 267–277.
- Quinn P. A lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membranes // *Cryobiology.* 1985. V. 22. P. 128–146.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe // *Theriogenology.* 2011. V. 75. P. 42–54.
- Schmitz G., Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids // *Prog. Lipid. Res.* 2008. V. 47. P. 147–155.
- Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. V. 50. P. 20–26.
- Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Act. (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids.* 2017. V. 1862. № 10. P. 1260–1272.
- Zahmel J., Jansch S., Jewgenow K., Sandgreen D., Skalborg Simonsen K., Colombo M. Maturation and fertilization of African lion (*Panthera leo*) oocytes after vitrification // *Cryobiology.* 2021. V. 98. P. 146–151.
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 61. P. 271–278.

Effects of Linoleic Acid on Cryopreservation of IVF-Obtained Domestic Cat Embryos

S. V. Okotrub^{1, 3}, D. A. Lebedeva^{1, 3}, K. A. Okotrub², E. A. Chuyko¹, E. Yu. Brusentsev¹, T. A. Rakhmanova^{1, 3}, and S. Ya. Amstislavsky^{1, *}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Koptuyuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Novosibirsk State University, Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: amstis@yandex.ru

The role of lipids in mammalian preimplantation development is a fundamental problem of the modern embryology. This is especially topical for early development in Carnivora and some other mammals, the species which oocytes and early embryos are lipid-rich. One of the promising approaches to improve cryotolerance in lipid-rich embryos is to modify their lipidome *in vitro*. This work aimed to study the effects of linoleic acid (LA) on the domestic cat embryos *in vitro* development and to evaluate how the change in lipid content affects the cryopreservation results. *In-vitro*-derived embryos were cultured with 400 μM LA for 66 h and randomly distributed between three groups: 1) for the evaluation the lipid amount in embryos and the stage of development; 2) for the estimation of the unsaturation degree in the intracellular lipids and the starting temperature of the lipid phase transition (T^*); 3) for the cryopreservation by program freezing. The rate of *in vitro* development was not affected in the LA-exposed non cryopreserved embryos. Nile red staining did not reveal changes in the lipid amount in the LA-treated embryos. However, Raman measurements showed that lipid unsaturation degree was higher in embryos after *in vitro* culture with LA. In the LA-treated embryos, T^* was lower, and the rate of blastocyst development was higher after cryopreservation as compared with controls. Thus, the exposure to LA *in vitro* led to the increase of lipid unsaturation degree and decrease of the T^* in cat embryos, which affected their development after cryopreservation.

Keywords: domestic cat, preimplantation embryo, *in vitro* culture, linoleic acid, cryopreservation, Raman spectroscopy

ОСОБЕННОСТИ РОСТА СИНЕГО КРАБА *Paralithodes platypus*
В СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ОХОТСКОГО МОРЯ© 2022 г. Д. В. Артеменков^а, *, С. В. Клинушкин^б, А. В. Харитонов^с, Д. О. Сологуб^а^аВсероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО),
Окружной проезд, 19, Москва, 105187 Россия^бМагаданский филиал ВНИРО (МагаданНИРО), ул. Портовая, 36/10, Магадан, 685000 Россия^сХабаровский филиал ВНИРО (ХабаровскНИРО), Амурский б-р, 13а, Хабаровск, 680028 Россия

*e-mail: dmitriy.artemenkov@gmail.com

Поступила в редакцию 06.03.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

Особенности роста синего краба *Paralithodes platypus* проанализированы на основе материалов учетно-ловушечных съемок, собранных на северо-востоке Охотского моря в заливе Шелихова в 2013–2015 гг., на северо-западе Охотского моря на участках западнее полуострова Лисянского в 2012–2015 гг., а также у Шантарских островов в 2011–2015 гг. Особенности роста различных возрастных групп самцов и самок синего краба описываются уравнением Бергаланфи. Это уравнение было получено с использованием метода размерного распределения ELEFAN, который был оптимизирован генетическим алгоритмом в среде программирования R. Анализ особенностей роста в различных экологических условиях позволил оценить адаптационные способности синего краба. Согласно полученным результатам, самцы в заливе Шелихова достигают предельных размеров ширины карапакса $CW_{inf} = 171.4$ мм, что выше, чем у полуострова Лисянского и Шантарских островов – 152.5 и 130.6 мм соответственно. Аналогичная ситуация наблюдается для самок, у которых предельная ширина карапакса составила 115.7 мм у Шантарских островов, 128.3 мм у полуострова Лисянского и 145.9 мм в заливе Шелихова. Темпы роста оказались достоверно выше для выборки из залива Шелихова, чем для выборки с северо-запада Охотского моря, где условия обитания менее благоприятны для синего краба.

Ключевые слова: синий краб, *Paralithodes platypus*, линейный рост, ELEFAN, генетический алгоритм, TropFishR, Охотское море

DOI: 10.31857/S0475145022050020

ВВЕДЕНИЕ

Род *Paralithodes* (семейство Lithodidae) включает 5 видов (Виноградов, 1947; Слизкин, Сафронов, 2000; McLaughlin et al., 2010), из которых самое широкое распространение имеют синий краб *P. platypus* (J.F. Brandt in von Middendorf, 1851), и камчатский краб *P. camtschaticus* (Tilesius, 1815). *P. platypus* (рис. 1) встречается в бореальной сублиторали вод Пацифики на глубинах от 10 до 500 м (Виноградов, 1950; Кобликов и др., 2010). Нативное распространение *P. camtschaticus* в значительной степени перекрывает распределение синего краба на глубинах от 2 до 461 м (Слизкин, Сафронов, 2000; Левин, 2001; Stevens, Lovrich, 2014). Остальные виды данного рода распространены иначе. Так, колючий краб *P. brevipes* (H. Milne Edwards & Lucas, 1841), обитает на малых глубинах до 60 м в бухтах и заливах западной части северной Пацифики (Komai, Yakovlev, 2000; Слизкин, Сафронов, 2000; Золотухина, 2009). У побережья

Северной Америки сосредоточены два вида – *P. californiensis* (Benedict, 1895), и *P. rathbuni* (Benedict, 1895), которые предпочитают глубины от 92 до 380 м и известны как “калифорнийский краб” (Wicksten, 1987, 2011; Love, York, 2005).

Сходство глубин и акваторий обитания синего и камчатского крабов обусловило интерес к углубленному изучению этих видов. В ходе таких исследований была выявлена высокая степень сходства морфологии, онтогенеза и поведения синего и камчатского крабов (Виноградов, 1946; Слизкин, Сафронов, 2000; Борисов и др., 2016). В районах совместного обитания, скопления синего краба смещены на участки дна с большими глубинами, где условия среды менее благоприятны, и наблюдаются более низкая температура (Кобликов и др., 2010; Stevens, Lovrich, 2014). В опубликованных ранее работах имеются сведения об особенностях морфологии, экологии, пищевого поведения и репродуктивной биологии предста-

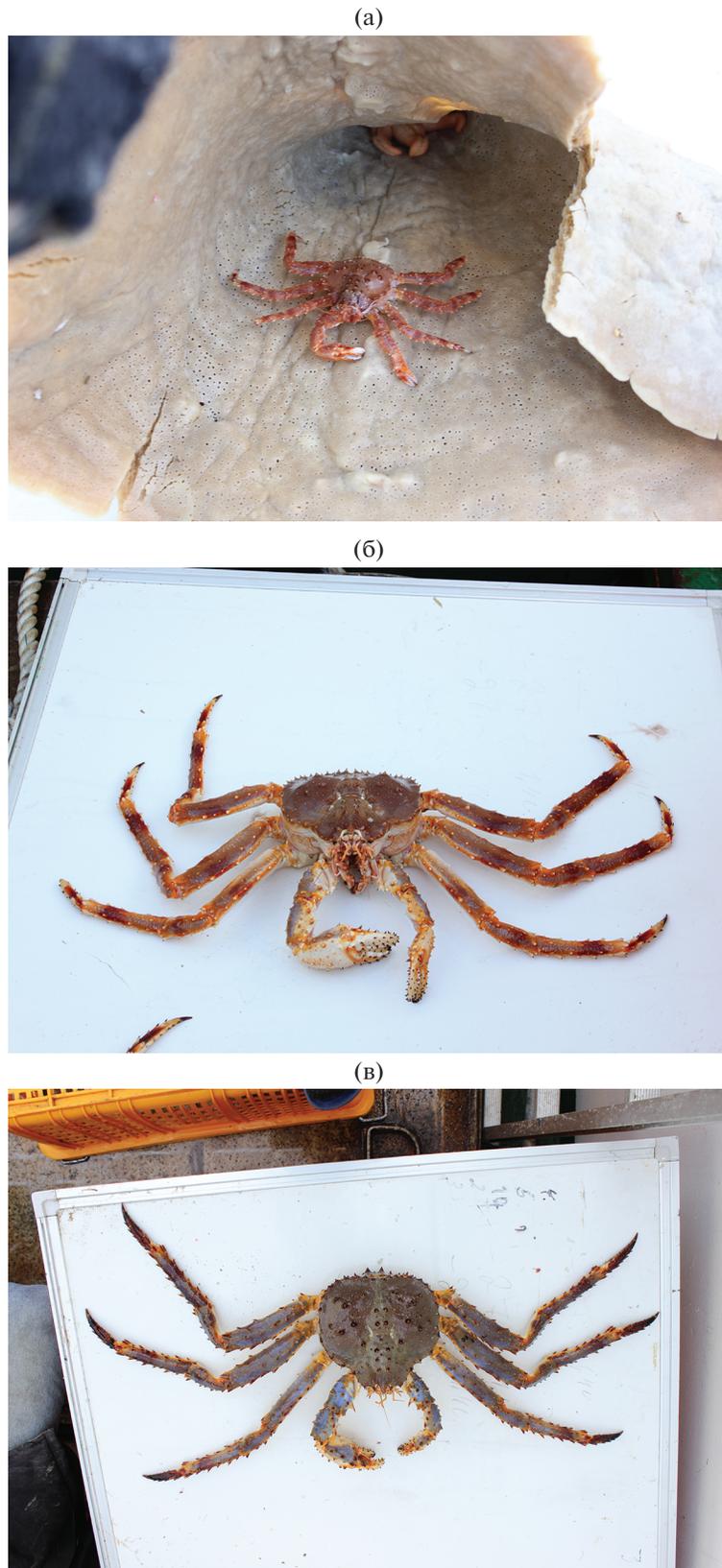


Рис. 1. Фотографии синего краба из залива Шелихова Охотского моря на различных периодах онтогенеза: (а) молодь 19 мм в возрасте 1+; (б) половозрелый самец 104 мм в возрасте 8+; (в) старая особь 149 мм в возрасте 18+.

вителей рода *Paralithodes* (Виноградов, 1947; Букин и др., 1988; Otto et al., 1990; Paul et al., 1991; Слизкин, Сафронов, 2000; Долженков, Жигалов 2001; Лысенко, 2001а; Левин, 2001; Пинчуков, Беренбойм, 2003; Filina, 2011; Dvoretzky, Dvoretzky, 2018; Клинушкин, 2019; Клинушкин и др., 2021). Однако, сведения об особенностях роста особей крабов в конкретных экологических условиях крайне ограничены (Powell, 1967; Виноградов, 1968; Лысенко, Гайдаев, 2005; Черниенко, 2010), а попытки определить темп роста синего краба немногочисленны (Hawkes et al., 1987; Otto, Cumiskey, 1989, 1990; Михеев, 2011; Федотов, Черниенко, 2019).

Исследования роста ракообразных сопряжены с определенными трудностями из-за периодических линек, которые обуславливают скачкообразную динамику прироста (Мина, Клевезаль, 1976; Клитин, 2003). Таким образом, рост ширины карапакса крабов определяется двумя факторами – приростом массы тела за линьку и частотой линек. При этом линька у молоди краба происходит значительно чаще, чем у взрослых особей (Harries, Henderson, 1938; Лысенко, Гайдаев, 2005).

Исследования возраст-регистрирующих структур для представителей рода *Paralithodes* не проводились. Однако встречаются работы, посвященные определению возраста других ракообразных по полосам роста эндокутикулы, содержанию флуоресцентных пигментов или липофусцина (Ettershank, 1984; Nicol, 1987; Belchier et al., 1994; Farber-Lorda, 1994; Siegel, Nicol, 2000; Kilda, Driscoll, 2017). Для определения возраста у синего краба были предприняты попытки использовать другие методы, такие как мечение, мониторинг в лабораторных условиях и анализ размерного состава особей в популяции. В 1993–1994 гг. и в 2010–2011 гг. сотрудниками МагаданНИРО было выполнено мечение 3650 экз. синего краба в северной части Охотского моря, но, к сожалению, успех возврата сведений составил всего четыре экземпляра. Таким образом, статистический анализ роста синего краба по результатам мечения, каким-либо структурам и содержанию пигментов в кутикуле не представляется возможными.

Особенности орудий лова ограничивают минимальный размер вылавливаемых особей при учетных (ловушечных) съемках. Как правило, у пойманных крабов значения ширины карапакса начинаются с 60 мм. Водолазный метод наиболее информативен для учета молоди, хотя также имеет ограничения – предел глубины обследования в большинстве случаев не превышает 40 м (Переладов, 2003). Поскольку с началом полового созревания прирост массы тела крабов замедляется, использовать данные размерных рядов для анализа периодов роста необходимо с осторожностью (Клитин, 2003; Stevens, Swiney, 2007).

Анализ особенностей роста синего краба может обеспечить оценку адаптационных способностей этого вида в различных экологических условиях северной части Охотского моря. Такие данные также необходимы для сравнительных межвидовых исследований (Дворецкий, 2011; Федотов, Черниенко, 2019). Нельзя не отметить, что данные о росте широко используются при изучении продукционных процессов в экосистемах (Винберг, Печень, 1968; Заика, 1972; Клитин, 2003; Лысенко, Гайдаев, 2005). Интерес к таким исследованиям обусловлен также большой численностью синего краба: в северной части Охотского моря промысел данного вида в последние годы достигает 4100 тонн. Кроме того, для математических моделей оценки численности популяций требуется знать темпы прироста массы особей различного возраста (Hilborn, Walters, 1992; Mildenerger et al., 2017). Целью данной работы является анализ особенностей роста синего краба в северной части Охотского моря, отражающих процесс адаптации *P. platypus* к различным условиям обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования роста были выполнены промеры половозрелых особей синего краба *P. platypus*, отловленных во время проведения учетно-ловушечных съемок (табл. 1) на северо-востоке Охотского моря в заливе Шелихова (2013–2015 гг.), на северо-западе Охотского моря западнее полуострова Лисянского (2012–2015 гг.) и у Шантарских островов (2011–2015 гг.) (рис. 2). Стандартными орудиями лова являлись краболовные порядки, состоящие из 30 ловушек. Крабовые ловушки имели форму усеченного конуса (Japan Conic-0.7), шаг ячеи сети, обтягивающей ловушку – 60 мм.

Биологический анализ крабов проводился в соответствии с общепринятой методикой изучения ракообразных. Ширина карапакса (ШК или CW – carapace width) измерялась штангенциркулем по наибольшему поперечному сечению головогруды (без учета шипов) с точностью до 1 мм. Пол определяли по внешним признакам особей (Родин и др., 1979; Низяев и др., 2006; Мельник и др., 2014). Объектами настоящего исследования послужили самцы и самки синего краба с шириной карапакса (ШК) от 52 до 192 мм и от 51 до 139 мм, соответственно (табл. 1). Всего изучено 48 300 экз. крабов, отловленных на глубинах от 12 до 428 м.

Для статистического анализа различий особей по ширине карапакса (CWc – carapace width catch), использовали экземпляры, отловленные конусовидными ловушками. Мы предполагали, что вероятность попадания особи в ловушку выше 50% согласно уравнению (Froese et al., 2018):

$$CWc = (CW_{10} + CW_{90})/2, \quad (1)$$

Таблица 1. Материал, собранный во время научных учетных съемок в северной части Охотского моря за период с 2011 по 2015 гг.

Дата начала экспедиции	Дата окончания экспедиции	Глубины отлова (минимум–максимум), м	Самцы		Самки	
			размах варьирования ШК, мм	количество измерений, экз.	минимум и максимум ШК, мм	количество измерений, экз.
Северо-восток Охотского моря, залив Шелихова						
02.05.2013	08.05.2013	100–428	73–181	5213	59–138	3067
01.05.2014	06.05.2014	97–406	73–187	5833	72–132	2574
13.04.2015	14.06.2015	96–400	64–192	9451	70–139	1545
Северо-запад Охотского моря, участок западнее полуострова Лисянского						
25.08.2012	09.09.2012	18–103	59–164	1558	54–123	718
14.09.2013	22.09.2013	21–80	66–157	758	70–124	462
06.09.2014	06.09.2014	22–104	53–158	956	58–123	346
01.09.2015	10.09.2015	12–88	57–158	639	64–121	400
Северо-запад Охотского моря, участок у Шантарских островов						
24.07.2011	25.08.2011	16–76	60–164	1205	58–130	636
29.07.2012	17.08.2012	21–79	52–168	4057	51–121	2071
25.07.2013	21.08.2013	14–75	62–158	1370	56–120	706
30.07.2014	14.08.2014	22–82	57–155	1352	60–119	888
27.07.2015	15.08.2015	18–79	54–143	1817	56–120	720

Примечание: ШК – ширина карапакса.

где CW_{10} – 10% процентиль ширины карапакса размерного распределения, CW_{90} – 90% процентиль ширины карапакса размерного распределения.

Для анализа зависимости между ШК и массой особи выполняли индивидуальные измерения

для 5107 самцов и 4006 самок с погрешностью до 0.5 г. Для расчета зависимости между ШК и массой особи использовалось уравнение степенной зависимости (Винберг, 1971):

$$W = aCW^b, \quad (2)$$

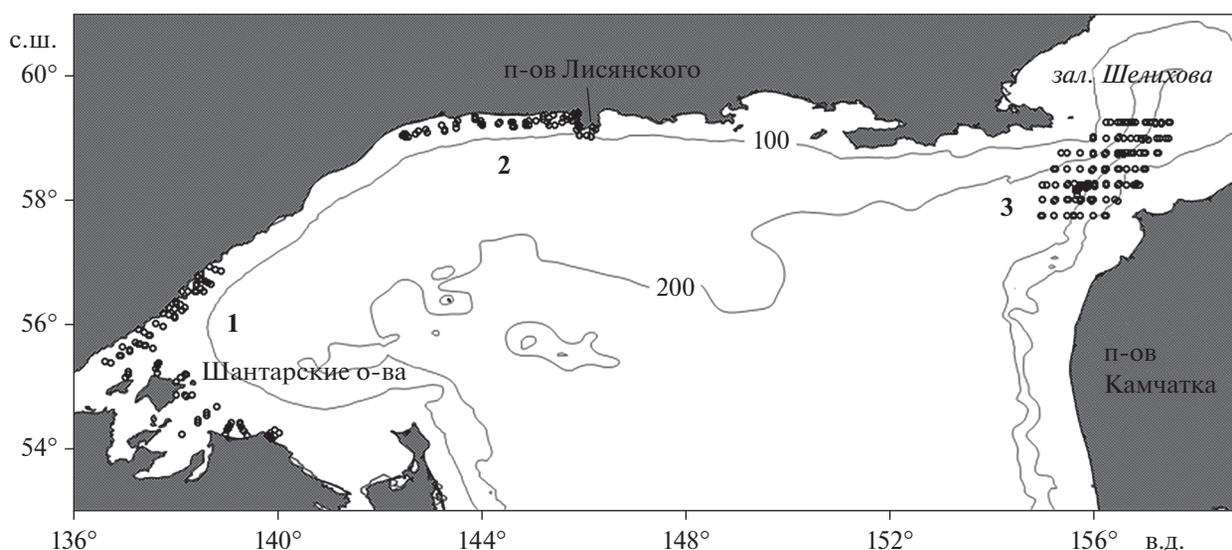


Рис. 2. Карта-схема мест сбора образцов для изучения особенностей роста синего краба (○ – места отбора проб; 1 – участок у Шантарских островов; 2 – участок западнее п-ва Лисянского; 3 – участок залива Шелихова).

где W – общая масса особи (г), CW – ширина карапакса (мм), a и b – константы.

Для дальнейшего выявления и сравнения различных периодов роста были определены половозрелость (2461 самец, 6733 самки) и стадии линьки (19464 самца). Определение половозрелости самцов проведено по измерению высоты клешни относительно ШК, а 50% половозрелость самок – по увеличению доли половозрелых самок с увеличением размеров (Низяев и др., 2006). Вероятность линьки рассчитывалась как доля крабов ранних стадий линьки в данном году (Лысенко, 2001а). Данные по долям ранних стадий линьки в разных размерных классах крабов аппроксимировались S-образной логистической кривой, с помощью которой находилось 50% вероятность линьки (сбрасывания экзоскелета) раз в два года.

Физиологическая зрелость определялась при осмотре и оценке созревания гонад. Оценка зрелости по морфометрическим данным основана на изменении пропорций тела крабов. Функциональная зрелость характеризует состояние непосредственной готовности к спариванию. На практике чаще всего определяют морфометрическую зрелость по морфометрическим показателям для самцов и функциональную зрелость для самок крабов (Somerton, Macintosh, 1983; Paul et al., 1991; Herter et al., 2011).

Для определения размера самцов, соответствующего наступлению половой зрелости, использовался морфометрический метод, основанный на нахождении точки перегиба кривой роста правой клешни относительно линейных размеров – ШК. Этот метод был подробно описан вначале для настоящих крабов (*Brachyura*) (Hartnoll, 1974, 1978), а позже начал применяться и для крабов-литодид (*Anomura*) (Somerton, 1980). Если рост клешни в высоту относительно ШК является изометрическим, то после созревания наблюдается увеличение скорости роста клешни. В этом случае для нахождения размера 50%-ной половозрелости можно использовать формулу линейной регрессии (Низяев и др., 2006).

У самок синего краба размер, соответствующий стадии половозрелости, находили по увеличению доли функционально половозрелых особей при увеличении размеров карапакса. Зрелую особь визуально можно отличить от ювенильной по наличию яиц или их остатков на плеоподах. Для неполовозрелых самок характерны плотно прижатый abdomen и наличие коротких волосков плеопод. Полученные эмпирические данные встречаемости половозрелых особей в разных размерных классах аппроксимировались S-образной логистической кривой, коэффициенты которой находились с помощью уравнения Ферхюльста (Лакин, 1990).

На основании анализа данных, полученных методом учетных ловушечных съемок, производили расчеты следующих показателей роста: ШК в возрасте t , теоретическое предельное значение ШК, константа роста, гипотетический возраст краба, при котором ШК равнялась нулю. Расчеты параметров линейного роста разновозрастных групп синего краба осуществляли по данным о размерном составе на основе вычисления средних размеров (ШК) в когортах. Для этого использовали статистический пакет TropFishR в среде программирования R (R Core Team, 2016; Mildenerberger et al., 2017). Пакет TropFishR дополняет традиционный метод статистического анализа размерного распределения ELEFAN (Electronic Length-Frequency Analysis), включающий определение параметров уравнения роста Бергаланфи (Bertalanffy, 1960; Haddon, 2011). Метод ELEFAN позволяет определить пики и пробелы в распределении частот за счет множественных итераций и корректирует кривую роста, которая проходит через максимальное количество пиков.

$$CW_t = CW_{inf} \left(1 - \exp(-K^{(t-t_0)}) \right), \quad (3)$$

где CW_t – ШК в возрасте t (мм), CW_{inf} – теоретическое предельное значение ШК (мм), K – константа роста (год^{-1}), t_0 – гипотетический возраст краба, при котором ШК равнялась нулю.

Для выполнения расчетов были подготовлены входные файлы, содержащие размерное распределение особей самцов и самок синего краба и даты исследований по годам. В программном коде применены настройки по умолчанию, в которых размерный шаг составил 2 мм, в части выделения когорт использовалось предположение о полиномиальном распределении в сочетании с законом Харди–Вайнберга. Количество выделенных когорт для самцов составило: 28 – для самцов из залива Шелихова, 51 – для выловленных у полуострова Лисянского и 53 – для выловленных у Шантарских островов. Количество когорт для самок составило соответственно 38, 40 и 40. Рассчитанное количество пиков отождествлялось с количеством возрастов у исследуемой выборки крабов. Пик нормального распределения характерен для каждого из возрастов, за исключением крайних групп. Крабов крайних групп затруднительно выловить. В случае молодежи это связано со специфическими для нее глубинами обитания и большим размером ячеек у сети ловушек. В случае крупных особей причиной является их меньшая численность, вероятно, из-за промышленного лова. Максимальный возраст популяции определили на основе возраста, связанного с ШК, равной 95% CW_{inf} (Taylor, Mildenerberger, 2017).

Для сравнения темпов линейного роста синего краба из скоплений на северо-востоке Охотского моря в заливе Шелихова (2013–2015 гг.), на севе-

Таблица 2. Распределение самцов и самок синего краба по глубинам в северной части Охотского моря с 2011 по 2015 гг., м

Пол	Расположение скопления	Сезонное распределение	Количество отловленных особей, шт.	Глубина, м				
				минимум	максимум	среднее значение и стандартная ошибка	стандартное отклонение	мода
Самцы	Залив Шелихова	Весеннее	15476	97	428	259.6 ± 0.7	88.9	340
		Летнее	5037	96	368	173.1 ± 0.8	61.1	156
	На участке западнее полуострова Лисянского	Летнее	3912	23	104	59.0 ± 0.3	15.7	50
	Участок у Шантарских островов	Летнее	8431	14	82	61.2 ± 0.1	12.2	70
Самки	Залив Шелихова	Весеннее	6297	97	406	138.9 ± 0.7	58.9	110
		Летнее	897	96	368	107.4 ± 1.0	30.2	96
	На участке западнее полуострова Лисянского	Летнее	1926	12	104	42.1 ± 0.4	18.6	20
	Участок у Шантарских островов	Летнее	4262	14	82	47.6 ± 0.2	14.4	56

ро-западе Охотского моря на участке западнее полуострова Лисянского (2012–2015 гг.) и на участке у Шантарских островов (2011–2015 гг.) использовали метод парных сравнений на основе *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Батиметрическое распределение синего краба

В период с 2011 по 2015 гг. летнее сезонное распределение скоплений у полуострова Лисянского и у Шантарских островов значительно отличалось по глубинам от такового в заливе Шелихова (табл. 2). Наиболее частые поимки самцов у Шантарских островов и у полуострова Лисянского зафиксированы на глубинах 70 и 50 м соответственно, в отличие от 156 м в заливе Шелихова. Иными словами, скопления самцов синего краба в заливе Шелихова были отмечены на значительно большей глубине, чем у полуострова Лисянского и у Шантарских островов ($t = 133.542$ при $p \leq 0.001$ и $t = 138.794$ при $p \leq 0.001$ соответственно). Помимо этого, размах глубин, на которых отлавливались самцы синего краба, в заливе Шелихова имеет наибольшую амплитуду – от 96 до 368 м. Это значит, что диапазон глубин распространения краба в заливе Шелихова шире, чем в западной части Охотского моря, у полуострова Лисянского (от 23 до 104 м) и у Шантарских островов (от 14 до 82 м).

Сходная картина наблюдается у самок синего краба в исследуемых скоплениях. Наиболее частый отлов самок у Шантарских островов и у по-

луострова Лисянского зафиксирован на глубинах 56 и 20 м соответственно. Это существенно меньшие глубины, чем глубины относительно частых поимок самок в заливе Шелихова – 96 м ($t = 58.648$ при $p \leq 0.001$ и $t = 60.631$ при $p \leq 0.001$ соответственно). Самки у Шантарских островов и у полуострова Лисянского, так же, как и самцы, встречаются в более узком диапазоне глубин (12–104 м), чем в заливе Шелихова (96–368 м).

Размерно-весовая характеристика синего краба

Ширина карапакса (ШК) самцов крабов (табл. 3), отловленных на участках у Шантарских островов и у полуострова Лисянского, варьировала от 52 до 168 мм и от 53 до 164 мм, составив в среднем 101.8 ± 0.2 и 110.6 ± 0.3 мм соответственно. Это существенно меньше ШК самцов в заливе Шелихова ($t = 136.855$ при $p \leq 0.001$ и $t = 68.947$ при $p \leq 0.001$ соответственно). Более высокое среднее значение ШК 132.4 ± 0.1 мм наблюдалось у крабов в заливе Шелихова, где лимиты размерного ряда были равны 73 и 192 мм. Таким образом, можно утверждать, что самцы из скоплений северо-запада Охотского моря имеют меньшие размеры по сравнению с крабами из залива Шелихова. Данное заключение подтверждается результатами анализа пороговой ширины карапакса (СWс), после достижения которой особи отлавливаются конусовидными ловушками с вероятностью свыше 50%. В заливе Шелихова данная величина составляет 132 мм, что выше, чем у Шантарских островов и у полуострова Лисянского – 102 и 110 мм соответ-

Таблица 3. Средние многолетние вариации размеров (ширины карапакса, мм) самцов и самок синего краба из выборок северной части Охотского моря с 2011 по 2015 гг.

Пол	Расположение скопления	Минимум	Максимум	Среднее значение и стандартная ошибка	Стандартное отклонение	Мода	CWc
Самцы	Залив Шелихова	73	192	132.4 ± 0.1	18	137	132
	На участке западнее полуострова Лисянского	53	164	110.6 ± 0.3	17.7	112	110
	Участок у Шантарских островов	52	168	101.8 ± 0.2	15.1	108	102
Самки	Залив Шелихова	59	139	100.8 ± 0.1	9.4	97	101
	На участке западнее полуострова Лисянского	54	124	90.3 ± 0.2	10.6	91	91
	Участок у Шантарских островов	51	130	82.4 ± 0.1	9.6	78	84

Таблица 4. Анализ зависимости между шириной карапакса и массой тела самцов и самок синего краба в северной части Охотского моря за период с 2011 по 2015 гг.

Пол	Расположение скопления	Количество измерений, экз.	Ширина карапакса максимальная, мм	Уравнение зависимости	R ²
Самцы	Залив Шелихова	924	198	$W = 10^{-3} 1.0 CW^{2.8808}$	0.99
	На участке западнее полуострова Лисянского	2033	164	$W = 10^{-4} 1.2 CW^{2.8445}$	0.97
	Участок у Шантарских островов	2150	168	$W = 10^{-4} 1.4 CW^{2.8256}$	0.97
Самки	Залив Шелихова	992	155	$W = 10^{-4} 5.9 CW^{2.5058}$	0.92
	На участке западнее полуострова Лисянского	1714	127	$W = 10^{-4} 1.6 CW^{2.798}$	0.94
	Участок у Шантарских островов	1300	130	$W = 10^{-4} 4.8 CW^{2.5589}$	0.94

Примечание: R² – коэффициент детерминации.

ственно. Таким образом, для скопления на северо-востоке Охотского моря характерно высокое число более крупных особей.

Сходная ситуация наблюдается для ШК самок крабов. На северо-западе Охотского моря величины CWc ниже, чем в заливе Шелихова. На участках у Шантарских островов и у полуострова Лисянского ШК варьировала от 51 до 130 мм и от 54 до 124 мм, составив в среднем 82.4 ± 0.1 и 90.3 ± 0.2 мм. Отмеченные значения существенно ниже, чем у самок крабов из залива Шелихова – 100.8 ± 0.1 мм ($t = 130.112$ при $p \leq 0.001$ и $t = 46.965$ при $p \leq 0.001$ соответственно). Лимиты размерного ряда самок из залива Шелихова также достигают больших значений: 59 и 139 мм.

Установлено, что самцы и самки синего краба, отловленные в заливе Шелихова, значительно крупнее особей из других скоплений в северной части Охотского моря (табл. 4). Так, в период учета максимальная ШК самцов из залива Шелихова

достигала 198 мм, что значительно выше 164 мм (участок у полуострова Лисянского) и 168 мм (участок у Шантарских островов). Наибольшая масса самцов была отмечена в заливе Шелихова – 3.11 кг при ширине карапакса 174 мм. У полуострова Лисянского наибольшая наблюдаемая масса самцов крабов составила 2.29 кг при ШК 164 мм, а у Шантарских островов – 2.15 кг при ШК 163 мм.

Линейные и весовые характеристики особей связаны аллометрической зависимостью. Для всех рассматриваемых скоплений синего краба в северной части Охотского моря отмечается, что наращивание массы тела происходит медленнее увеличения ШК (см. табл. 4). Следовательно, весовой рост в рассматриваемых скоплениях крабов характеризуется отрицательной аллометрической зависимостью ($b < 3$). Так, самцы синего краба из залива Шелихова имеют более высокий показатель степени b размерно-весового уравнения (2.88), чем самцы из скоплений у полуострова Ли-

сянского (2.84) и Шантарских островов (2.82). Наоборот, самки из скоплений у полуострова Лисянского и Шантарских островов характеризуются более высоким значением степени в уравнения весового роста (2.79 и 2.55), чем самки из залива Шелихова (2.50).

Сравнение линейного роста крабов из разных местообитаний

Рост крабов рассматриваемых скоплений Охотского моря вполне адекватно описывается уравнением Бергаланфи. Кривые группового роста, найденные с использованием программы ELEFAN, были оптимизированы с помощью генетического алгоритма (рис. 3). Расчетная модель хорошо описывает имеющиеся данные, полученные для одного сезона года. В результате найдены уравнения (4)–(6), в соответствии с которыми самцы, обитающие в заливе Шелихова, достигают в течение жизни большей предельной ширины карапакса (171.4 мм), чем самцы из скоплений у полуострова Лисянского и Шантарских островов (152.5 и 130.6 мм соответственно). На фоне рассчитанных уравнений группового роста для скоплений из изученных районов, не являются исключением особи, которые в ходе индивидуального роста достигают более крупных размеров. Например, отмечены быстрорастущие особи больших размеров (см. табл. 4), чем предельные размеры в изучаемых скоплениях.

Уравнение роста для скопления самцов в заливе Шелихова,

$$CW_t = 171.43 \left(1 - \exp^{-0.119(t - 0.516)} \right), \quad (4)$$

для скопления самцов у полуострова Лисянского,

$$CW_t = 152.55 \left(1 - \exp^{-0.063(t - 0.686)} \right), \quad (5)$$

для скопления самцов у Шантарских островов,

$$CW_t = 130.68 \left(1 - \exp^{-0.062(t - 0.382)} \right). \quad (6)$$

Анализ полученных данных позволяет заключить, что наиболее высокими темпами линейного роста обладают особи, не достигшие половой зрелости. По полученным уравнениям Бергаланфи были рассчитаны приросты размеров и массы. Таким образом, абсолютные годовые приросты самцов до достижения размера морфометрической половозрелости (Клинушкин, 2018, 2022) составили: для особей возраста 1–6 лет из залива Шелихова – в среднем 13.6 мм; для особей 1–10 лет из скоплений у полуострова Лисянского – 6.8 мм; для особей 1–13 лет у Шантарских островов – 5.5 мм. Абсолютные годовые приросты массы тела самцов составили: 54 г для выборки из залива Шелихова, 19 г – у полуострова Лисянского и 18 г – у Шантарских островов.

Темп линейного роста самцов синего краба после наступления половой зрелости существенно снижается ввиду расхода энергии преимущественно на процессы, связанные с размножением. В результате, с 7 до 18 лет самцы залива Шелихова характеризуются приростами ШК от 2.7 до 10.0 мм (в среднем 5.6 мм), массы – от 95 до 145 г (в среднем 127.3 г). Следовательно, самцы скопления у полуострова Лисянского с 11 до 26 лет имеют приросты ШК от 2.0 до 5.2 мм (в среднем 3.4 мм) и массы от 45 до 55 г (в среднем 51.8 г), а у Шантарских островов с 14 до 31 года прирастают соответственно от 1.3 до 3.6 мм (в среднем 2.2 мм) и от 26 до 37 г (в среднем 33.7 г).

Ряд авторов обосновывает возможность выделения третьего периода роста – периода старости (Никольский, 1965; Мина, Клевезаль, 1976), в котором наблюдаются особи с явными признаками физиологического старения. В этот период происходит затухание функции размножения, а линейный рост минимален или прекращается вовсе. Расчетные данные показывают, что линейный рост самцов залива Шелихова сильно замедляется с 19 по 23 годы жизни. Приросты ШК (от 1.5 до 2.4 мм) и массы тела (от 59 до 87 г) минимальны. В итоге, за рассматриваемый период общие приросты длины и массы тела оказываются незначительными и составляют 9.6 мм и 364 г соответственно. Аналогичный период у самцов участка у полуострова Лисянского отмечается с 27 по 35 лет, когда общие приросты также незначительны – 13.4 мм и 354 г. Соответственно, самцы у Шантарских островов прирастают с 32 до 42 лет на 10.3 мм и 240 г.

При рассмотрении уравнений роста самок (7)–(9), был получен аналогичный результат. В течение жизни наименьшей предельной ШК достигают особи, отловленные у Шантарских островов (115.7 мм) относительно скоплений у полуострова Лисянского (128.3 мм) и залива Шелихова (145.9 мм). При этом зафиксирован факт проявления наибольшего индивидуального роста самки из выборки у Шантарских островов (130 мм) относительно особей из выборки у полуострова Лисянского (127 мм) (см. табл. 4). Найденные кривые группового роста самок синего краба в северной части Охотского моря представлены на рис. 4.

Уравнение роста для скопления самок в заливе Шелихова,

$$CW_t = 145.97 \left(1 - \exp^{-0.085(t - 0.756)} \right), \quad (7)$$

для скопления самок у полуострова Лисянского,

$$CW_t = 128.36 \left(1 - \exp^{-0.083(t - 0.506)} \right), \quad (8)$$

для скопления самок у Шантарских островов,

$$CW_t = 115.71 \left(1 - \exp^{-0.085(t - 0.866)} \right). \quad (9)$$

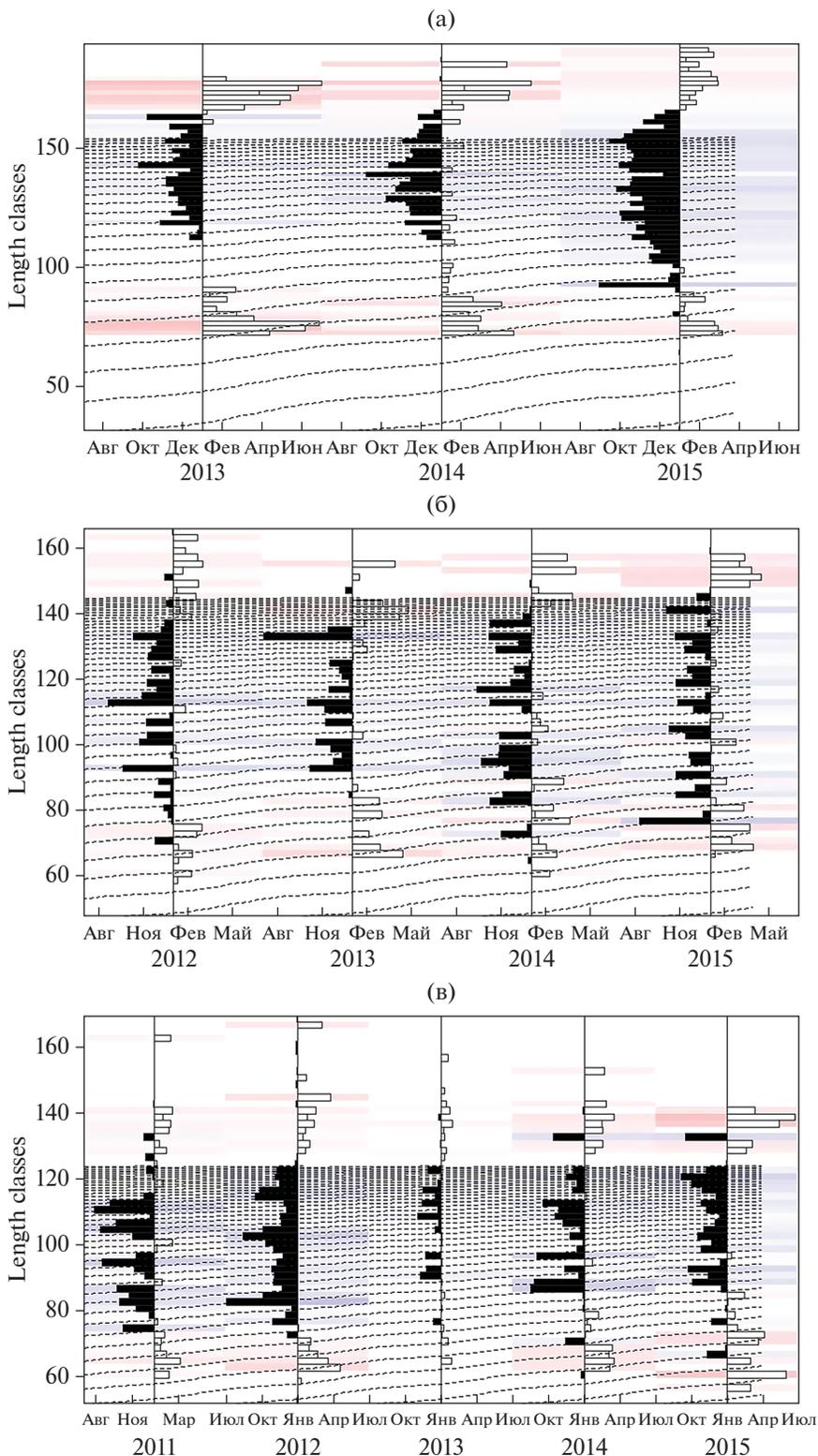


Рис. 3. Размерно-частотное распределение когорт по ширине карапакса (length classes) и кривые роста (пунктирная линия) для самцов синего краба в заливе Шелихова (а), у полуострова Лисянского (б) и Шантарских островов (в). Примечание: черные столбцы на гистограммах обозначают пик частотного распределения по собранным материалам, а белые столбцы – пик частотного распределения реконструированный расчетами.

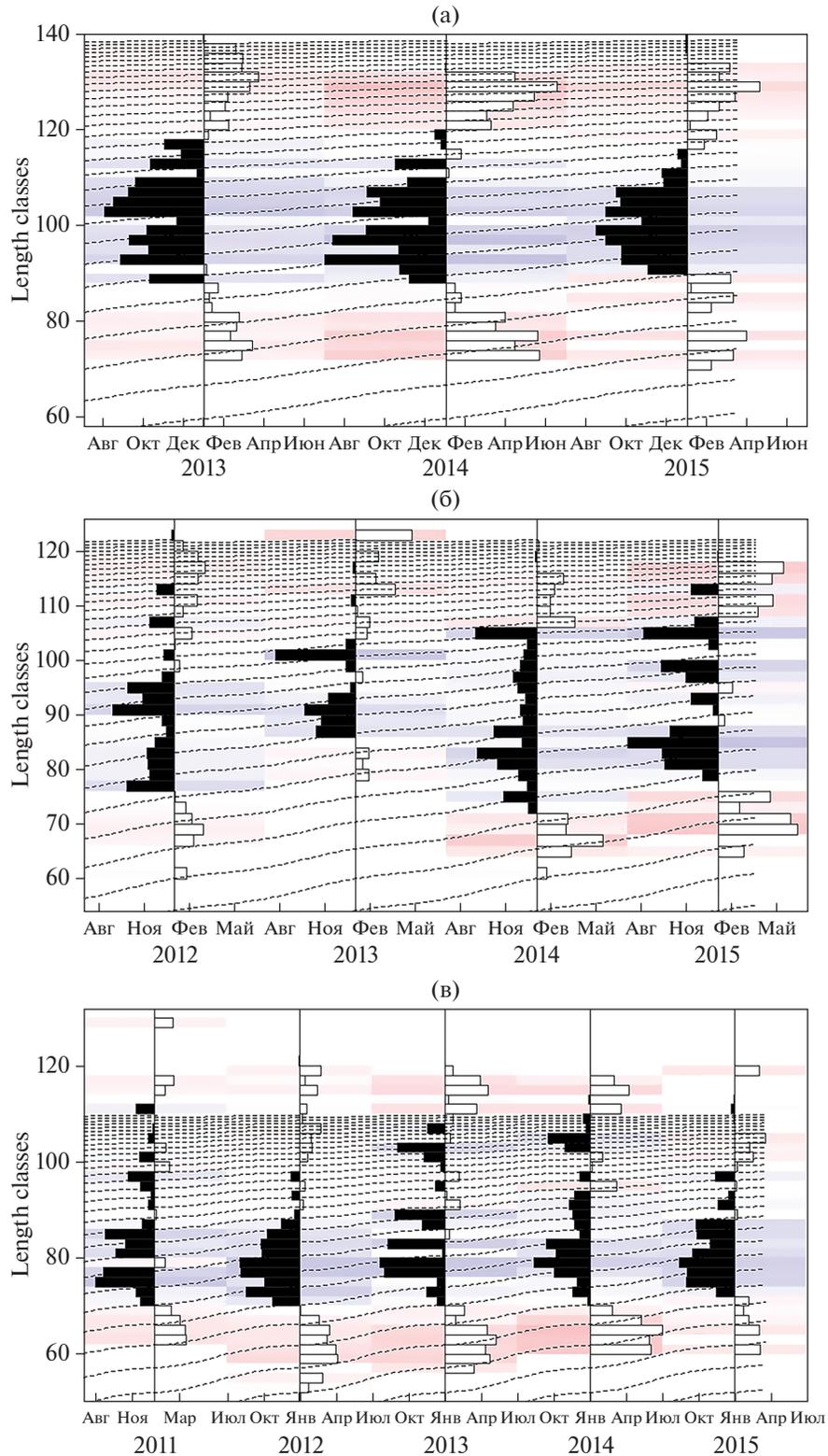


Рис. 4. Размерно-частотное распределение когорт по ширине карапакса (length classes) и кривые роста (пунктирная линия) для самок синего краба в заливе Шелихова (а), у полуострова Лисянского (б) и Шантарских островов (в). Примечание: черные столбцы на гистограммах обозначают пик частотного распределения по собранному материалу, а белые столбцы — пик частотного распределения реконструированный расчетами.

Таблица 5. Размеры самцов и самок синего краба разного возраста, рассчитанные по уравнениям роста, полученным для разных скоплений в северной части Охотского моря, мм

Возраст, лет	Самцы			Самки		
	залив Шелихова	участок западнее полуострова Лисянского	участок у Шантарских островов	залив Шелихова	участок западнее полуострова Лисянского	участок у Шантарских островов
1	9.6	3.0	4.9	3.0	5.1	1.3
2	27.7	12.1	12.5	14.6	14.9	10.6
3	43.8	20.7	19.5	25.3	23.9	19.1
4	58.1	28.7	26.2	35.2	32.2	26.9
5	70.7	36.3	32.5	44.2	39.8	34.1
6	82.0	43.4	38.4	52.5	46.8	40.8
7	92.0	50.1	43.9	60.1	53.3	46.8
8	100.9	56.3	49.1	67.1	59.3	52.4
9	108.8	62.2	54.0	73.5	64.7	57.6
10	115.8	67.7	58.6	79.4	69.8	62.3
11	122.0	72.9	62.9	84.9	74.4	66.6
12	127.6	77.8	67.0	89.8	78.7	70.6
13	132.5	82.3	70.8	94.4	82.6	74.2
14	136.8	86.6	74.4	98.6	86.3	77.6
15	140.7	90.6	77.8	102.5	89.6	80.7
16	144.1	94.4	81.0	106.0	92.7	83.5
17	147.2	98.0	84.0	109.3	95.5	86.1
18	149.9	101.3	86.8	112.3	98.1	88.5
19	152.3	104.4	89.4	115.0	100.5	90.7
20	154.5	107.4	91.9	117.5	102.7	92.8

Аналогично самцам, наиболее высокими темпами линейного роста обладают особи самок, не достигшие половой зрелости (Клинушкин, 2018, 2022). Исходя из уравнения Бергаланфи, для самок всех скоплений наибольшие абсолютные годовые приросты ШК наблюдаются в возрасте 1–9 лет в заливе Шелихова (в среднем 8.2 мм), 1–10 лет в акватории у полуострова Лисянского (в среднем 6.9 мм) и 1–12 лет у Шантарских островов (в среднем 5.8 мм). Абсолютные годовые приросты массы тела самок составили 31 г для особей в заливе Шелихова, 21 г – у полуострова Лисянского и 21 г – у Шантарских островов.

В период наступления половой зрелости с 10 до 21 года самки из залива Шелихова характеризуются приростами ШК от 2.3 до 5.9 мм (в среднем 3.9 мм), массы – от 45 до 61 г (в среднем 56 г). Можно рассчитать, что, если половозрелые самки линяют один раз в два года, то прирост за линьку составляет в среднем 7.8 мм и 112 г. Самки из скопления у полуострова Лисянского в период половой зрелости с 11 до 26 лет имеют приросты ШК от 1.4 до 4.7 мм (в среднем 2.7 мм) и массы от

28 до 44 г (в среднем 38.4 г), а из скопления у Шантарских островов у особей с 13 до 30 лет приросты составляют соответственно 0.9–3.6 мм (в среднем 1.9 мм) и 15–470 г (в среднем 26.1 г).

Расчетные данные показывают, что в период старости линейный рост самок из залива Шелихова сильно замедляется с 22 по 30 годы жизни. Приросты ШК (от 1.1 до 2.1 мм) и массы тела (от 25 до 43 г) минимальны. В рассматриваемый период общие приросты длины и массы тела оказались незначительны и составили 13.9 мм и 303 г соответственно. Аналогичный период у самок участка у полуострова Лисянского отмечается с 27 по 36 лет, когда общие приросты также незначительны – 8.7 мм и 196 г. Соответственно, самки у Шантарских островов прирастают с 31 до 41 года на 6.2 мм и 115 г.

При сравнении полученных результатов для выборки из залива Шелихова, участков западнее полуострова Лисянского и у Шантарских островов (табл. 5), видно, что рассчитанные значения ШК синего краба отличались. Проведено парное сравнение полученных нами показателей для

особей из залива Шелихова с аналогичными показателями, полученными для особей на участках у полуострова Лисянского и Шантарских островов. Были обнаружены достоверные различия роста самцов ($t = 14.348$ при $p < 0.001$ и $t = 12.470$ при $p < 0.001$ соответственно) и самок ($t = 7.496$ при $p < 0.001$ и $t = 10.138$ при $p < 0.001$ соответственно), указывающие на то, что особи из залива Шелихова достигали более крупных размеров. Достоверно различаются эти показатели и при сопоставлении особей, отловленных на участке у Шантарских островов, и особей участка у полуострова Лисянского ($t = -7.099$ при $p < 0.001$ и $t = -17.278$ при $p < 0.001$). Однако, в этом случае скорость роста самцов и самок синего краба у Шантарских островов была ниже, чем у полуострова Лисянского.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отличия в летнем батиметрическом распределении скоплений синего краба в Охотском море связаны в первую очередь, с гидрологическими условиями районов обитания. В летний период на северо-западных участках синий краб распределяется в узкой прибрежной полосе более теплых вод, его перемещения ограничивает ядро холода (-1.7°C) (Чернявский, 1992а), формируемое охотоморской водной массой. Охотоморская водная масса располагается здесь на дне, как холодный подстилающий слой, и занимает обширные площади шельфа. В заливе Шелихова холодный промежуточный слой размывается со стороны Западной Камчатки за счет активного динамического перемешивания вод. Со стороны глубоководного желоба происходит приток глубинных теплых вод северной ветви Западно-Камчатского течения (Чернявский, 1992б), которые выходят из желоба на шельф залива Шелихова и размывают холодный слой. За счет этих процессов в летний период придонный слой на прикамчатском шельфе залива Шелихова имеет положительные значения температуры, что позволяет синему крабу обитать в широком диапазоне глубин.

Различия в структуре вод влияют и на миграционную активность синего краба в северной части Охотского моря. У Западной Камчатки выявляется трехслойная структура вод: верхний квазиоднородный слой толщиной до 30–40 м, холодный промежуточный слой, который подстилается глубинными более теплыми океаническими водами, проникающими в Охотское море через Курильские проливы. Это позволяет половозрелым особям синего краба в северо-восточной части Охотского моря совершать продолжительные сезонные миграции. Летом крабы в основном концентрируются на небольших глубинах, где происходит их откорм и нерест при наилучших условиях для развития икры и выхода личинок, затем на зиму

крабы мигрируют на глубины. Таким образом, происходят циклические миграции с глубины на мелководье и наоборот, благодаря которым крабы выбирают наиболее благоприятные пищевые и гидрологические условия (Слизкин, 1972; Букин и др., 1988). Скопления синего краба на северо-западе Охотского моря не демонстрируют ярко выраженных сезонных миграций (Родин, Мясоедов, 1982; Букин и др., 1988). В северо-западной части Охотского моря после охлаждения отепленных прибрежных вод в результате осенне-зимней конвекции, синий краб остается зимовать при отрицательных температурах, и находится там до начала летнего прогрева прибрежных вод.

В исследовании охарактеризованы условия обитания крабов, а именно, температура среды, которая тесно связана с ростом и скоростью развития у пойкилотермных животных. Среднегодовой прирост в течение жизни выше у популяций, обитающих при более высокой температуре, чем у популяций, обитающих при более низких температурах (Weymouth et al., 1931; Винберг, Печень, 1968). Именно поэтому на участках северо-запада Охотского моря наблюдаются более низкие показатели линейного и весового роста синего краба, чем в заливе Шелихова.

Статистически значимые различия размера и массы крабов в северной части Охотского моря могут быть обусловлены, кроме различия гидрологических условий обитания, также разной пищевой продуктивностью рассматриваемых участков. Установлено, что в диапазоне температур, близких к оптимальным, изменения темпа роста могут не соответствовать изменениям температуры. Это объясняется тем, что другие факторы, и в первую очередь обеспеченность пищей, могут иметь преобладающее влияние на темп роста (Ansell, 1968). В.Н. Кобликов с соавт. (1990), изучавшие бентос континентального шельфа Охотского моря, отметили, что в заливе Шелихова, за счет его большой площади, сосредоточено более четверти всего запаса шельфовой донной фауны Охотского моря. При этом средняя биомасса составляет 548 г/м^2 с преобладанием двустворчатых моллюсков, усонюгих ракообразных и серых морских ежей. Среднее значение биомассы бентоса на североохотоморском шельфе также довольно велико: 359 г/м^2 , с преобладанием двустворчатых моллюсков и иглокожих. Аяно-Шантарский район характеризуется увеличением роли эпифауны: здесь преобладают губки, а также двустворчатые моллюски, усонюгие ракообразные и офиуры. Средняя биомасса бентоса здесь составляет 294 г/м^2 . В целом рассмотренные участки моря достаточно богаты заселены донными животными, а главенствующие формы бентоса встречаются в пищевом спектре синего краба (Кун, Микулич, 1954; Тарвердиева, 1979; Надточий и др., 1999; Кли-

нушкин, 2018). Необходимо отметить, что на обилие кормового бентоса в питании синего краба могут оказывать влияние конкурентные отношения других гидробионтов. Например, на участке у Шантарских островов наблюдается наибольшее перекрытие ареалов синего и камчатского крабов, что приводит к высокой пищевой конкуренции в скоплениях у полуострова Лисянского и в заливе Шелихова (Левин, 2001; Кобликов и др., 2010).

Отрицательная аллометрическая зависимость между линейными и весовыми характеристиками крабов в скоплениях северной части Охотского моря обусловлена, скорее всего, особенностями физиологического состояния крабов в весенне-летний период: значительной затратой энергии на сезонные миграции и воспроизводство. Воспроизводство связано с достижением особями половой зрелости и, вероятно, совпадает по времени с наибольшим замедлением роста. Для анализа особенностей роста самцов и самок синего краба из скоплений в северной части Охотского моря с помощью уравнения Бергаланфи, были выделены периоды роста: период до наступления половой зрелости, период после наступления половой зрелости и период старости.

Для этого была найдена граница между периодом неполовозрелости и периодом наступления половой зрелости. В северо-восточной части Охотского моря половозрелые особи самцов и самок отмечались при достижении размеров 88.5 и 79.4 мм соответственно, на участках западной части Охотского моря – 73.3 и 71.7 мм (Клинушкин, 2022). Интересно отметить факт, замеченный Буяновским и др. (1999): самки синего краба на западно-камчатском шельфе становятся половозрелыми на 9–10 году жизни, что совпадает с данными других исследований Клинушкина (2022). Вероятно, продуцирование половых продуктов самками происходит при такой же ШК. Так, необходимо отметить, что рост самок и самцов *P. camtschaticus* не различается до наступления размера 50%-ной половозрелости, при схожей скорости роста и динамике размерно-весовых показателей синего и камчатского крабов (Webber, 1967; Somerton, Macintosh, 1983; Dew, 1990; Pual et. al., 1991; Лысенко, Гайдаев, 2005; Дворецкий, 2011; Борисов и др., 2016).

Поиск границы между периодом половозрелости и старости оказался возможным благодаря особенностям линьки ракообразных: линька у молоди краба происходит значительно чаще, чем у взрослых особей, а по мере роста крабов частота линек снижается. На основании этого можно предположить, что достижение определенных размеров, при которых линька происходит один раз в два года, является началом периода старости. Для самцов из залива Шелихова такая вели-

чина ШК составила 150 мм, для самцов из скоплений у полуострова Лисянского и Шантарских островов – 130 и 110 мм соответственно (Лысенко, 2001a; Клинушкин, 2022).

Для самок синего краба из северо-восточной части Охотского моря определен двухлетний репродуктивный цикл, что вероятно распространяется и на самок из других скоплений. Так, при достижении половозрелости самки синего краба спариваются и откладывают икру раз в два года и соответственно линяют с такой же периодичностью (Буяновский и др., 1999; Лысенко, 2001b). Поэтому имеются трудности в определении начала периода старости у самок. Так как исследователи отмечают сходство скорости роста самок и самцов в период неполовозрелости, можно предположить, что продолжительность периода половой зрелости у них одинакова. У самцов из залива Шелихова продолжительность периода половой зрелости составила 12 лет, у самцов из скоплений у полуострова Лисянского и Шантарских островов – 16 и 18 лет соответственно. На основании отмеченной длительности периода половой зрелости самцов определена продолжительность периода половой зрелости у самок, после которого начинается период старости. У самок из залива Шелихова период половой зрелости составил с 10 до 21 года, у самок из выборки у полуострова Лисянского – с 11 до 26 лет, а у самок из скоплений у Шантарских островов с 13 до 30 лет.

Рассчитанные уравнения роста для скоплений в Охотском море позволили обнаружить различия общей продолжительности жизни и длительности периодов роста. Эти различия являются следствием различий в условиях обитания крабов: температура у полуострова Лисянского и Шантарских островов понижена по сравнению с заливом Шелихова. На основании расчетов, выполненных по уравнениям роста, общая продолжительность жизни самцов крабов составила: 23 года – для скопления залива Шелихова, 35 лет – у полуострова Лисянского и 42 года – у Шантарских островов. Общая продолжительность жизни самок составила 30, 36 и 41 год, соответственно. Согласно исследованиям других авторов, изучавшим рост синего краба в Беринговом море и на восточном шельфе Сахалина, продолжительность жизни самцов составила 21 и 23 года соответственно (Михеев, 2011; Федотов, Черниенко, 2019). Вероятно, условия обитания синего краба в заливе Шелихова близки к условиям на восточном шельфе Сахалина и в Беринговом море.

Для синего краба в Охотском море наблюдается увеличение продолжительности жизни при обитании в более прохладных водах. То есть продолжительность жизни крабов в заливе Шелихова, где температура воды сравнительно выше, меньше, чем крабов, обитающих у Шантарских

островов, где температура воды ниже. Сходная особенность выявлена для морского черенка *Siliqua patula* из десяти популяций побережья США, где от южных популяций к северным увеличивается общая продолжительность жизни (Weymouth et al., 1931).

Различия длительности периодов роста тако- вы: в период половой зрелости активный рост самцов на участках северо-западной части Охотского моря продолжается 16 лет у полуострова Лисянского и 18 лет у Шантарских островов, а в заливе Шелихова – всего 12 лет. У крабов из скопления в заливе Шелихова наблюдается наивысший темп роста. Поэтому половой зрелости самцы достигают уже на 7 году жизни, в отличие от крабов из скоплений у полуострова Лисянского и Шантарских островов (11 и 14 годы соответствен- но). По всей видимости, различные условия обита- ния накладывают специфический отпечаток на относительную популяционную продуктивность и морфометрические индексы синего краба (Клинушкин, 2019; Клинушкин и др., 2021).

Для крабов в заливе Шелихова, обитающих при более высокой температуре, характерна специфическая продолжительность периодов роста и уменьшение общей продолжительности жизни. На основании данных, полученных на других членистоногих, можно предположить, что для них характерны и некоторые другие особенности: уменьшение длительности периода между линь- ками, увеличение частоты линек и увеличение прироста за линьку (Hale, 1965; Leersnyder, 1972; Dvoretzky, Dvoretzky, 2014, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение параметров роста синего краба из скоплений в северной части Охотского моря, а именно в заливе Шелихова, на участках западнее полуострова Лисянского и у Шантарских островов, выявило достоверные различия в размерах и массе особей. Полученный результат является свидетельством адаптации синего краба к разным условиям обитания. Более высокие темпы роста и более крупные размеры особей отмечены в скоп- лении в заливе Шелихова по сравнению с изучен- ными участками в северо-западной части Охот- ского моря.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Т.Б. Морозову и А.Ю Яковлеву (КамчатНИРО), Д.А. Ботневу (ВНИРО), Д.А. Абаеву (МагаданНИРО), помогавшим в сборе ма- териала в море, а также сотрудникам ХабаровскНИРО.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа подготовлена в рамках ежегодного мониторинга и выполнения государственного задания Минобрнауки РФ в 2011–2015 гг.

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 инте- ресов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.В. Артеменков – проведение размерно-частотно- го анализа и расчет темпов роста синего краба, стати- стический анализ, написание и подготовка рукописи; С.В. Клинушкин, А.В. Харитонов, Д.О. Сологуб – сбор биоматериала, интерпретация результатов, напи- сание и редактирование рукописи. Все авторы участ- вовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борисов Р.Р., Печенкин Д.С., Ковачева Н.П. и др. Срав- нение раннего онтогенеза синего *Paralithodes platy- pus* и камчатского *Paralithodes camtschaticus* крабов (Decapoda, Lithodidae) // Труды ВНИРО. 2016. Т. 163. С. 94–107.
- Букин С.Д., Мясоедов В.И., Низяев С.А. и др. Динамика пространственного распределения и некоторые особенности биологии синего краба северной ча- сти Тихого океана // Морские промысловые беспоз- звоночные. Сборник научных трудов. М.: ВНИРО, 1988. С. 4–16.
- Буяновский А.И., Вагин А.В., Полонский В.Е. и др. О не- которых особенностях экологии камчатского и си- ного крабов в районе северо-западной Камчатки // Прибрежные гидробиологические исследования. М.: ВНИРО, 1999. С. 126–142.
- Винберг Г.Г. Линейные размеры и масса тела животных // Журнал общей биологии. 1971. Т. 32. № 6. С. 714–723.
- Винберг Г.Г., Печень Г.А. Рост, скорость развития и пло- довитость в зависимости от условий среды // Мето- ды определения продукции водных животных. Минск: Вышэйшая школа, 1968. С. 45–47.
- Виноградов Л.Г. О географическом распространении камчатского краба // Известия ТИНРО. 1946. Т. 22. С. 195–232.
- Виноградов Л.Г. Десятиногие ракообразные Охотского моря // Известия ТИНРО. 1947. Т. 25. С. 67–125.
- Виноградов Л.Г. Определитель креветок, раков и кра- бов Дальнего Востока // Известия ТИНРО. 1950. Т. 33. С. 180–356.

- Виноградов Л.Г. Камчатское стадо крабов // Природа. 1968. № 7. С. 43–50.
- Дворецкий А.Г. Модель роста молоди камчатского краба в Баренцевом море // Труды Зоологического института РАН. 2011. Т. 315. № 1. С. 75–84.
- Долженков В.Н., Жигалов И.А. Особенности распределения крабов *Chionoecetes opilio*, *Lithodes aequispina*, *Paralithodes platypus* (Crustacea: Decapoda) и гидрологические условия их обитания на материковом склоне северо-восточной части Охотского моря в летний период // Известия ТИНРО. 2001. Т. 128. С. 611–619.
- Заика В.Е. Удельная продукция водных беспозвоночных. Киев: Наукова думка, 1972. 142 с.
- Золотухина Л.С. Колючий краб *Paralithodes brevipes* северо-западной части Татарского пролива и его плодовитость // Известия ТИНРО. 2009. Т. 157. С. 107–119.
- Клинушкин С.В. Питание синего краба *Paralithodes platypus* в заливе Бабушкина (Охотское море) в 2011 г. // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. П.-Камчатский. 2018. Вып. 49. С. 69–74. <https://doi.org/10.15853/2072-8212.2018.49.69-74>
- Клинушкин С.В. Плодовитость синего краба в северной части Охотского моря // Труды ВНИРО. 2019. Т. 175. С. 36–47.
- Клинушкин С.В., Харитонов А.В., Диденко Д.С. Внутривидовая морфологическая изменчивость синего краба северной части Охотского моря // Труды ВНИРО. 2021. Т. 185. С. 22–31. <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2021-185-22-31>
- Клинушкин С.В. Размер половозрелости синего краба *Paralithodes platypus* в северной части Охотского моря // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2022. № 64. С. 34–39.
- Клитин А.К. К вопросу об определении возраста камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) // Труды СахНИРО. 2003. Т. 5. С. 133–145.
- Кобликов В.Н., Борилко О.Ю., Пономарев С.С. О росте численности синего краба (*Paralithodes platypus*) в заливе Петра Великого (Японское море) // Известия ТИНРО. 2010. Т. 16. С. 68–78.
- Кобликов В.Н., Павлючков В.А., Надточий В.А. Бентос континентального шельфа Охотского моря: состав, распределение, запасы // Известия ТИНРО. 1990. Т. 111. С. 27–38.
- Кун М.С., Микулич Л.В. О составе пищи дальневосточных крабов в летний сезон // Известия ТИНРО. 1954. Т. 41. С. 319–332.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- Левин В.С. Камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*. Биология, промысел, воспроизводство. СПб.: Ижица, 2001. 198 с.
- Лысенко В.Н. Особенности линьки камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) на западнокамчатском шельфе // Исследования биологии промысловых ракообразных и водорослей морей России. Сборник научных трудов. М.: ВНИРО, 2001а. С. 111–119.
- Лысенко В.Н. Особенности биологии самок синего краба *Paralithodes platypus* в северо-восточной части Охотского моря // Известия ТИНРО. 2001б. Т. 128. Ч. 2. С. 523–532.
- Лысенко В.Н., Гайдаев В.Э. Рост камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) в северной части западнокамчатского шельфа // Известия ТИНРО. 2005. Т. 143. С. 119–127.
- Мельник А.М., Абаев А.Д., Васильев А.Г. и др. Крабы и крабоиды северной части Охотского моря. Магадан: МагаданНИРО, 2014. 198 с.
- Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.
- Михеев А.А. Возрастная детерминация размерного состава улова на основе разделения смеси вероятностных распределений // Исслед. водн. биол. ресурсов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана. 2011. Вып. 22. С. 77–91.
- Надточий В.А., Чучукало В.И., Кобликов В.Н. Особенности питания синего краба (*Paralithodes platypus*) в Беринговом море в осенний период // Известия ТИНРО. 1999. Т. 126. С. 113–116.
- Низяев С.А., Букин С.Д., Клитин А.К. и др. Пособие по изучению промысловых ракообразных дальневосточных морей России. Южно-Сахалинск: СахНИРО, 2006. 114 с.
- Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб как биологическая основа рациональной эксплуатации и воспроизводства рыбных ресурсов. М.: Наука, 1965. 382 с.
- Переладов М.В. Особенности распределения и поведения камчатского краба на прибрежных мелководьях Баренцева моря // Камчатский краб в Баренцевом море. 2-е изд., перераб. и доп. Мурманск: ПИНРО, 2003. С. 152–170.
- Пинчуков М. А., Беренбойм Б. И. Линька и рост камчатского краба в Баренцевом море // Камчатский краб в Баренцевом море. 2-е изд., перераб. и доп. Мурманск: ПИНРО, 2003. С. 100–106.
- Родин В.Е., Слизкин А.Г., Мясоедов В.И. и др. Руководство по изучению десятиногих ракообразных Декапода дальневосточных морей. Владивосток: ТИНРО, 1979. 59 с.
- Родин В.Е., Мясоедов В.И. Биологическая характеристика популяции камчатского краба в северо-западной части Охотского моря // Известия ТИНРО. 1982. Т. 106. С. 3–10.
- Слизкин А.Г. Экологическая характеристика беринговоморской популяции синего краба (*Paralithodes platypus* Brandt, 1850) // Известия ТИНРО. 1972. Т. 81. С. 201–208.
- Слизкин А.Г., Сафронов С.Г. Промысловые крабы прикамчатских вод. Петропавловск-Камчатский: Северная Пацифика, 2000. 180 с.
- Тарвердиева М.И. Питание синего краба *Paralithodes platypus* в Беринговом море // Биология моря. 1979. № 1. С. 53–57.
- Федотов П.А., Черниенко И.С. Размерный состав и темпы роста самцов синего краба (*Paralithodes platypus* Brandt, 1850) в российском секторе Берингова моря // Известия ТИНРО. 2019. Т. 196. С. 81–89. <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2019-196-81-89>

- Черниенко И.С. Рост камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* в северо-западной части Охотского моря // Известия ТИНРО. 2010. Т. 163. С. 1–25.
- Чернявский В.И. Циркуляционные системы Охотского моря // Известия ТИНРО. 1981. Т. 105. С. 13–19.
- Чернявский В.И. Особенности формирования термики деятельного слоя Охотского моря // Океанол. основы биол. продуктив. сев.-зап. части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО, 1992. С. 91–104.
- Шунтов В.П. Биология дальневосточных морей России. Т 1. Владивосток: Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр), 2001. 580 с.
- Ansell A.D. The rate of growth of the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.) throughout the geographical range // ICES J. Marine Science. 1968. V. 31. № 3. P. 364–409. <https://doi.org/10.1093/icesjms/31.3.364>
- Belchier M.P., Shelton M., Chapman C.J. The identification and measurement of fluorescent age-pigment abundance in the brain of a crustacean (*Nephrops norvegicus*) by confocal microscopy // Comp. Biochem. Physiol. B. 1994. V. 108. P. 157–164. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90061-2)
- Bertalanffy L. Von. Principles and theory of growth // Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth. Amsterdam: Elsevier, 1960. P. 137–259.
- Dew C.B. Behavioral ecology of podding red king crab, *Paralithodes camtschatica* // Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences. 1990. V. 47. P. 1944–1958. <https://doi.org/10.1139/f90-219>
- Dvoretzky A.G., Dvoretzky V.G. Size-at-age of juvenile red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) in the coastal Barents Sea // Cahiers de Biologie Marine. 2014. V. 55. № 1. P. 43–48. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.D19FAC73>
- Dvoretzky A.G., Dvoretzky V.G. Size at maturity of female red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, from the coastal zone of Kola Peninsula (southern Barents Sea) // Cahiers de Biologie Marine. 2015. V. 56. № 1. P. 49–54. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.9EBE5D8C>
- Dvoretzky A.G., Dvoretzky V.G. Red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) fisheries in Russian waters: historical review and present status // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2018. V. 28. № 2. P. 331–353. <https://doi.org/10.1007/s11160-017-9510-1>
- Ettershank G. A new approach to the problem of longevity in the Antarctic Krill (*Euphausia superba*) // J. Crustacean Biol. 1984. V. 4. P. 295–305. <https://doi.org/10.1163/1937240X84X00679>
- Farber-Lorda J. Length-weight relationships and coefficient of condition of *Euphausia superba* and *Thysanoessa macrura* (Crustacea: Euphausiacea) southwest Indian Ocean during summer // Mar. Biol. 1994. V. 118. P. 645–650. <https://doi.org/10.1007/BF00347512>
- Filina E.A. Spermatogenesis and physiological maturity of male red king crab (*Paralithodes camtschaticus*, Tilesius 1815) and snow crab (*Chionoecetes opilio* Fabricius, 1788) in the Barents Sea // Marine Biology Research. 2011. V. 7. P. 289–296. <https://doi.org/10.1080/17451000.2010.497188>
- Froese R., Winker H., Coro G. et al. A new approach for estimating stock status from length frequency data // ICES J. Marine Science. 2018. V. 75. № 6. P. 2004–2015. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy078>
- Haddon M., Modelling and Quantitative Methods in Fisheries. 2nd ed. London: Chapman & Hall CRC Press, 2011. 449 p.
- Hale W.G. Post-embryonic development in some species of Collembola // Pedobiologia. 1965. V. 5. № 3. P. 228–243.
- Harries F.H., Henderson C.F. Growth of insects with reference to progression factors for successive growth stages // Ann. Entomol. Soc. America. 1938. V. 31. P. 557–572. <https://doi.org/10.1093/aesa/31.4.557>
- Hartnoll R.G. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda, Brachyura) // Crustaceana. 1974. V. 27. № 2. P. 131–136.
- Hartnoll R.G. The determination of relative growth in Crustacea // Crustaceana. 1978. V. 34. № 3. P. 281–293.
- Hawkes C.R., Meyers T.R., Shirley T.C. Growth of Alaska blue king crab, *Paralithodes platypus* (Brandt), parasitized by the rhizocephalan *Briarosaccus callosus* Boschma // Crustaceana. 1987. V. 52. P. 78–84.
- Herter H., Daly B., Swingle J.S., Lean C. Morphometrics, fecundity, and hatch timing of blue king crabs (*Paralithodes platypus*) from the Bering Strait // J. Crustacean Biology. 2011. V. 31. № 2. P. 304–312. <https://doi.org/10.1651/10-3348.1>
- Hilborn R., Walters C.J. Quantitative fisheries stock assessment: choice, dynamics and uncertainty. N.Y.: Chapman and Hall, 1992. 570 p.
- Kilda R., Driscoll J.G. Age determination in crustaceans: a review // Hydrobiologia. 2017. V. 799. P. 21–36. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3233-0>
- Komai T., Yakovlev Y.M. Decapod crustaceans collected during the biological expedition to the Kamchatka Peninsula and the North Kuril Islands in 1997 // Natural History Research Special Issue. 2000. № 7. P. 301–322.
- Leersnyder M. De. Influence de la temperature sur la frequence des muccs et le taux do croissance d'Eriocheir sinensis H. Milne-Edwards (Crustace Decapode Brachyoure) // Cahiers de Biologie Marine. 1972. V. 13. № 3. P. 351–355.
- Love M.S., York A. A comparison of the fish assemblages associated with an oil/gas pipeline and adjacent seafloor in the Santa Barbara Channel, Southern California Bight // Bulletin of Marine Science. 2005. V. 77. P. 101–117.
- McLaughlin P.A., Komai T., Lemaitre R. et al. Part I. Lithoidea, Lomisoidea & Paguroidea // Annotated Checklist of Anomuran Decapod Crustaceans of the World (Exclusive of the Kiwaoidea and Families Chirostylidae and Galatheidae of the Galatheoidea). Raffles Bulletin of Zoology. 2010. V. 23. P. 5–107.
- Mildenberger T.K., Taylor M.H., Wolff M. TropFishR: an R package for fisheries analysis with length-frequency data // Methods in Ecology and Evolution. 2017. V. 8. № 11. P. 1520–1527. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12791>

- Nicol S.* Some limitations on the use of the lipofuscin ageing technique // *Mar. Biol.* 1987. V. 93. P. 609–614. <https://doi.org/10.1007/BF00392798>
- Otto R.S., Cummiskey P.A.*, Growth of adult male blue king crab (*Paralithodes platypus*) // *Proceedings of the International Symposium on King and Tanner Crabs*. Fairbanks: University of Alaska Fairbanks, 1989. P. 245–258.
- Otto R.S., Macintosh R.A., Cummiskey P.A.*, Fecundity and other reproductive parameters of female red king crab (*Paralithodes camtschatica*) in Bristol Bay and Norton Sound, Alaska // *Proceedings of the International Symposium on King and Tanner Crabs*. Fairbanks: University of Alaska Fairbanks, 1990. P. 65–90.
- Paul, J.M., Paul A.J., Otto R.S. et al.* Spermatophore presence in relation to carapace length for eastern Bering Sea blue king crab (*Paralithodes platypus*, Brandt, 1850) and red king crab (*P. camtschaticus*, Tilesius, 1815) // *J. Shellfish Research*. 1991. P. 10. № 1. P. 157–163.
- Powell G.C.* Growth of king crabs in the vicinity of Kodiak Island, Alaska // *Alaska Department of Fish and Game Informational Leaflet*. Report № 92. Kodiak: Alaska Department of Fish and Game, 1967. 106 p.
- R Core Team.* R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2016. Vienna, Austria. (Electronic resource). URL: <http://www.R-project.org/> (дата обращения: 11.02.2020 г.).
- Scrucca L.* GA: A Package for Genetic Algorithms in R // *J. Statistical Software*. 2013. V. 53. № 4. P. 1–37. <https://doi.org/10.18637/jss.v053.i04>
- Scrucca L.* On some extensions to GA package: hybrid optimization, parallelization and islands evolution. 2016. arXiv: 1605.01931. (Electronic resource). URL: <http://www.arxiv.org/abs/1605.01931> (дата обращения: 02.08.2021 г.).
- Siegel V., Nicol S.* Population parameters // *Krill Biology, Ecology and Fisheries*. London: Blackwell Science, 2000. P. 103–149.
- Somerton D.A., Macintosh R.A.* The size at sexual maturity of blue king crab, *Paralithodes platypus*, in Alaska // *Fishery Bulletin*. 1983. V. 81. № 3. P. 621–628.
- Stevens B.G., Swiney K.M.* Growth of female red king crabs *Paralithodes camtschaticus* during pubertal, primiparous, and multiparous molts // *Alaska Fish. Res. Bull.* 2007. V. 12. P. 270–277.
- Stevens B.G., Lovrich G.A.* King crabs of the World: Species and distributions // *King Crabs of the World Biology and Fisheries Management*. FL: Taylor & Francis Group, 2014. P. 1–29.
- Taylor M.H., Mildenerberger T.K.* Extending electronic length frequency analysis in R // *Fisheries Management and Ecology*. 2017. V. 24. № 4. P. 330–338. <https://doi.org/10.1111/fme.12232>
- Weber D.D.* Growth of the immature king crab *Paralithodes camtschatica* (Tilesius) // *Bulletin of the International North Pacific Fisheries Commission*. 1967. V. 21. P. 21–53.
- Weymouth F.W., McMillan H.C., Rich W.H.* Latitude and relative growth in the razor clam, *Siliqua patula* // *J. Exp. Biol.* 1931. V. 8. № 3. P. 228–249.
- Wicksten M.K.* Range extensions of offshore decapod crustaceans from California and western Mexico // *CA: California Fish and Game*. 1987. V. 73. P. 54–56.
- Wicksten M.K.* Decapod Crustacea of the Californian and Oregonian Zoogeographic Provinces. Auckland: Magnolia Press, 2011. 307 p.

Growth Features of Blue King Crab *Paralithodes platypus* in the Northern Part of the Sea of Okhotsk

D. V. Artemenkov^{1,*}, S. V. Klinushkin², A. V. Kharitonov³, and D. O. Sologub¹

¹Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Okružhnoy proezd, 19, Moscow, 105187 Russia

²Magadan Branch of VNIRO (MagadanNIRO), Portovaya street, 36/10, Magadan, 685000 Russia

³Khabarovsk Branch of VNIRO (KhabarovskNIRO), Amurskij avenue, 13a, Khabarovsk, 680028 Russia

*e-mail: dmitriy.artemenkov@gmail.com

Growth characteristics of the blue king crab *Paralithodes platypus* inhabiting the northern part of the Sea of Okhotsk were analyzed. The samples have been collected by the trap-recapture surveys in the northeastern Okhotsk Sea (Shelikhov Bay) in 2013–2015, in the northwestern Okhotsk Sea (west of the Lisyansky Peninsula) in 2012–2015, and near the Shantar Islands in 2011–2015. Growth peculiarities of different age groups of male and female crabs are described by Bertalanffy equation. This equation was obtained using the ELEFAN dimensional distribution method, which was optimized by a genetic algorithm in the R software environment. Analysis of growth patterns under different environmental conditions allowed us to assess the adaptive abilities of blue king crab. The males in the Shelikhov Bay reach the maximal carapace width (CW_{inf}) 171.4 mm that is larger than CW_{inf} of the males from the Lisyansky Peninsula (152.5 mm), and Shantar Islands (130.6 mm). A similar growth pattern has been observed in females. They reach the maximal CW_{inf} of 145.9 mm in the Shelikhov Bay, of 128.3 mm in the Lisyansky Peninsula, and 115.7 mm in the Shantar Islands. Growth rates were significantly higher for crabs from the Shelikhov Bay than for crabs from the northwestern Sea of Okhotsk, where habitat conditions are less favorable for blue crab.

Keywords: blue king crab *Paralithodes platypus*, linear growth, ELEFAN, genetic algorithm, TropFishR, Sea of Okhotsk

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ПОЛОВОЙ ПЛАЗМЫ *germes* В ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТКАХ ООЦИТА *X. LAEVIS*

© 2022 г. В. В. Кондукторова^а, *, Н. Н. Лучинская^а, А. В. Белявский^б

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Вавилова, 32, Москва, 119991 Россия

*e-mail: virgo584@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

Во время оогенеза большая часть мРНК локализуется на вегетативном полюсе ооцита в особой области, называемой половой плазмой. Половая плазма играет существенную и необходимую роль в спецификации первичных половых клеток. Ген *germes* прежде охарактеризован нами как ранний маркер первичных половых клеток. В настоящей работе с помощью полученной нами иммунной сыворотки исследован синтез белка *Germes* в яичниках и раннем развитии шпорцевой лягушки. Мы также обнаружили белок в фолликулярных клетках, окружающих растущие ооциты. Факт наличия белка *Germes* в фолликулярных клетках требовал дальнейшего исследования наличия мРНК в них. Для этого была применена *in situ* гибридизация фолликулов с зондом к *germes*, совмещенная с электронной микроскопией. Было установлено присутствие мРНК *germes* в фолликулярных клетках. Транскрипт находился в цитоплазме и ядрах самих фолликулярных клеток как больших, так и малых фолликулов, а также в пространстве между ооцитом и фолликулярными клетками. Сравнительный анализ экспрессии мРНК *germes* в фолликулярных клетках и ооцитах показал, что уровни экспрессии в фолликулярном слое и ооцитах больших стадий сопоставимы. Содержание транскрипта в фолликулярных клетках малых ооцитов превышало таковое в самих ооцитах. Доказано наличие непротранскрипированной мРНК в фолликулярном слое в течение всего оогенеза, что говорит о самостоятельной экспрессии гена половой плазмы *germes* в них.

Ключевые слова: ооциты *Xenopus*, половая плазма, фолликулярные клетки, *Germes*, *in situ* гибридизация совместно с электронной микроскопией, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0475145022050032

ВВЕДЕНИЕ

Линия половых клеток у *Xenopus* выделяется благодаря наследованию специальных детерминант, локализующихся на вегетативном полюсе ооцита в виде островков половой плазмы (ПП). В состав ПП входят специфические матричные и нетранскрипуемые РНК и белки: XCat-2 (Mosquera et al., 1993), vegT (Zhang, King, 1996), XDazl (Houston et al., 1998), Xpat (Hudson, Woodland, 1998), DEADSouth (MacArthur et al., 2000), Dead end (Weidinger et al., 2003), Hermes (Zearfoss et al., 2004), Xotx1 (Pannese et al., 2000), fatvg (Chan et al., 2001), syntabulin (Colozza, De Robertis, 2014), grip2.1 (Tarbashevich, 2007), rtn3.1, gpt11, exd2 (Cuykendall, Houston, 2010), sox7 (Butler et al., 2018) и др. Открытый ранее нашей группой *germes* дополнил этот ряд (Berekelya et al., 2003). Было показано, что экспрессия РНК *germes* начинается уже на I стадии развития ооцита. На стадиях I–II транскрипт распределен диффузно. На стадии II–III РНК локализуется в митохондриальном облаке,

однако часть сохраняет диффузное распределение в цитоплазме. С распадом митохондриального облака РНК заякоревается в вегетативном кортексе ооцитов вместе с другими маркерами ПП, локализующимися по раннему пути (Berekelya et al., 2003). Далее, начиная с первых суток развития и до стадии гастролы, содержание транскрипта в зародышах постепенно падает по сравнению с уровнем экспрессии в зрелых ооцитах. К стадии средней нейрулы (ст. 15) материнский транскрипт не детектируется. Такое снижение количества мРНК после оплодотворения характерно для материнских транскриптов (Yang et al., 2015). Функция *Germes* в составе ПП остается во многом неизвестной, однако ранее нам удалось показать, что оверэкспрессия белка дикого типа и одной из мутантных форм оказывает негативное влияние на формирование первичных половых клеток (ППК) (Berekelya et al., 2007). Нарушается их миграция, уменьшается количество и нарушается поздняя локализация маркеров ПП в клетках.

С помощью двугибридной дрожжевой системы нам также удалось выявить белки-партнеры Germes. Ими оказались легкие цепи динеина Dlc8a и Dlc8b. На основании этого было выдвинуто предположение о возможной транспортной функции белка Germes в составе половой плазмы.

Наши знания о маркерах половой плазмы большей частью опираются на результаты исследования содержания и локализации их матричных РНК. Данных о содержании и локализации белков в ооцитах и зародышах меньше. Задачей данной работы было исследовать экспрессию белка Germes в оогенезе и раннем развитии. С помощью окраски сывороткой/антителами белок был обнаружен в течение оогенеза и раннем развитии, а также в ППК в процессе их миграции в половую железу. Неожиданно белок и мРНК были обнаружены в фолликулярных клетках (ФК), окружающих растущие ооциты. Ни для одного из генов ПП экспрессия в ФК не была установлена ранее. Известно, что ФК являются производными эпителиального компартмента яичника, т.е. имеют соматическое происхождение (Ogielska, Kotusz, 2004). Макровилли (МВ) фолликулярных клеток пронизывают желточную оболочку и формируют щелевые контакты с микровиллями ооцита, осуществляя прямой транспорт веществ. МВ образуются в центральной части клетки в количестве до 50–70 шт. (Konduktorova, Luchinskaya, 2013). Закономерно, встал вопрос о происхождении белка: транспорт из ооцита мРНК или белка Germes или экспрессия в самих ФК. Методами ПЦР-РВ и гибридизацией *in situ* в сочетании с электронной микроскопией была показана экспрессия мРНК в ФК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение проб из ооцитов разных стадий роста и оболочек с них

Ооциты *X. laevis* были выделены вручную диссекцией из яичников. Ооциты стадий I–III и фолликулярные оболочки с них были изолированы друг от друга путем инкубации в растворе коллагеназы (2 µg/ml, *stude collagenase IA*, Sigma C2674) в бескальциевом 1× MMR. Фолликулы инкубировались на горизонтальном шейкере 2–3 часа при 37°C до полной диссоциации. Оболочки ооцитов V–VI стадии (50–70 шт.) были сняты вручную с помощью пинцетов в растворе MMR (с 2х кратной концентрацией NaCl). Полученные таким образом образцы малых ооцитов и клеток оболочек с них были использованы для выделения тотальной РНК с помощью TRIZOL (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя. Все образцы были обработаны ДНКазой для удаления гДНК. кДНК была синтезирована с помощью M-MuLV ревертазы (набор компании Евроген # SK021) с использованием рандомных гексануклеотидов (Silex).

Эмбрионы были получены с помощью оплодотворения *in vitro* стандартным методом (Newport, Kirschner, 1982), и поэтапно собраны необходимые стадии развития в соответствии с таблицами нормального развития *X. laevis* (Nieuwkoop, Faber, 1956).

Для вестерн-блоттинга ооциты и эмбрионы (15 шт.), соответствующих стадий, гомогенизировали в 400 мкл буфера EBC (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche #11836153001). Центрифугировали и отбирали среднюю фракцию для последующего анализа.

Получение и очистка антител

Кроличьи поликлональные антитела были получены против рекомбинантного белка (GenBank accession number NP_001082512.1), состоящего из растворимой части Germes (ак 378–502; всего 125 ак), слитого с GST. Белок был экспрессирован в Rosetta штамме *E. coli*, а затем хроматографически очищен с использованием глутатион-сефарозы (Liu et al., 2014). Иммунизация кроликов проводилась 5 раз согласно стандартному протоколу (Wang et al., 2015). Сыворотка была проверена на специфичность с помощью вестерн-блоттинга против рекомбинантных белков, слитых с концевыми метками: His-Germes, Muc-Germes и GFP-Germes, синтезированных в ооцитах *X. laevis*. В качестве отрицательного контроля использовали преиммунную сыворотку.

Иммунная сыворотка против Germes была очищена согласно протоколу для Xpat антител (Machado et al., 2005), используя рекомбинантный белок, состоящий из растворимой части белка Germes, кодирующей две гидрофильные области белка (всего 338 ак) и 6xHis. Для получения большего количества рекомбинантного белка, конструктор His-Germes был клонирован в pET-21d-2c вектор (любезно предоставленный А.В. Ивановым; Ivanov et al., 2006). Около 1 мг рекомбинантного белка переносили с ПААГ (PROTEAN® II xi cell, Bio-Rad laboratories) на PVDF мембрану (Bio-Rad laboratories, 1620177). Позицию полосы определяли с помощью Ponceau S (Sigma, P7170-1L), вырезали и проводили блокировку в 4% обезжиренном молоке в PBS 1 ч при комнатной температуре с ротацией. Далее полосу мембраны с рекомбинантным белком нарезали на более мелкие и отмывали в PBS 3 раза по 10 мин и инкубировали ночь при 4°C с 2 мл сыворотки. После 5-кратной отмывки PBS–Tween-20 (0.05%) антитела элюировали 1 мл 200 mM глицина (pH 2.3) в течение 1 минуты 5 раз. К каждому образцу элюции добавляли 150 мкл 1 M Tris pH 8.8 для нейтрализации.

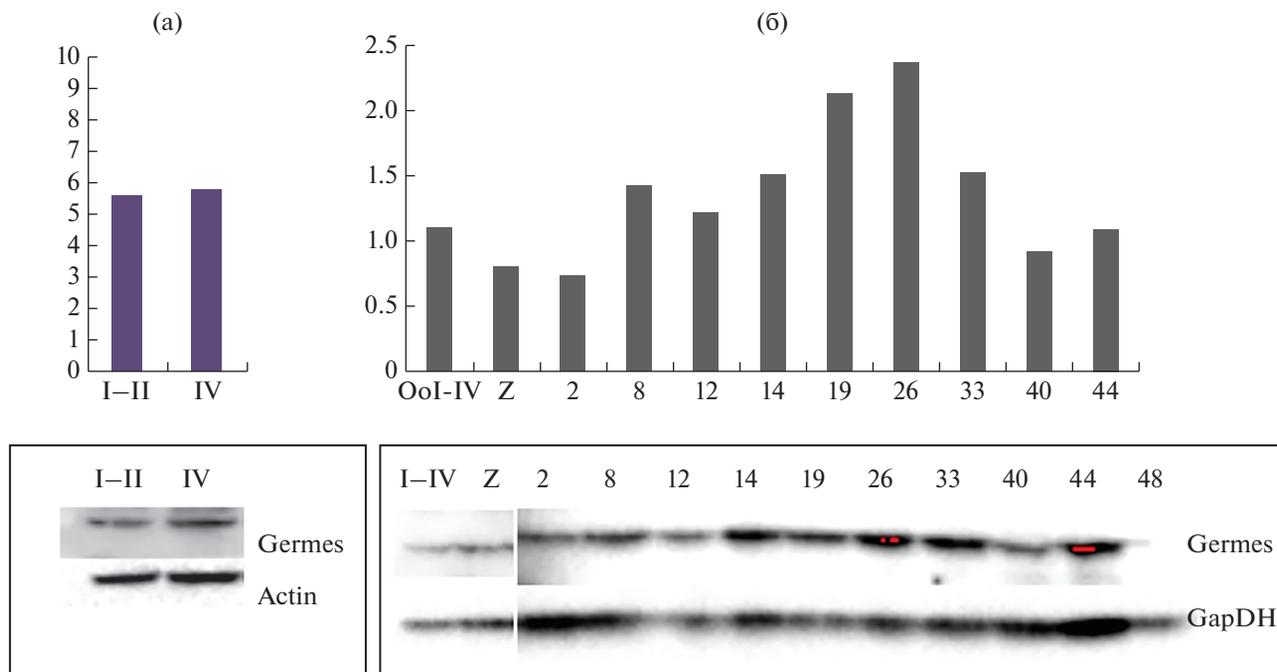


Рис. 1. Белок *Germes* в ооцитах и эмбрионах *X. laevis*. Вестерн-блоттинг анализ уровней экспрессии белка *Germes* (ось *Y* на графиках) лизатов ооцитов I–II и IV стадии со всеми оболочками (а) и зародышей ранних стадий развития (б), нормированных по экспрессии Actin/GapDH. OoI-IV – ооциты стадий I–IV со всеми оболочками, Z – неоплодотворенные ооциты VI стадии; 2–48 – стадии развития по Nieuwkoop and Faber. Белку *Germes* соответствует полоса около 70 кДа.

Иммунологические техники

Процедуру вестерн-блоттинга выполняли по протоколу Sambrook и Russell (Sambrook, Russell, 2001) с использованием системы Bio Rad. Перенос белков осуществляли на PVDF мембрану (Immune-blot BioRad). Использованные первичные антитела: anti-*Germes* (поликлональные антитела, полученные нами, 1 : 1500), anti-Actin (Cell Signaling Technology, #3700, 1 : 3000) и Anti-GapDH (Cell Signaling Technology #2118; 1 : 5000) для нормировки количества нанесенного общего белка в каждую лунку PAAG. Вторичные антитела: HRP goat anti-rabbit (Santa Cruz # sc-2004, 1 : 10000), HRP goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch # 10015289, 1 : 50000). Для визуализации сигнала использовали набор Thermo Fisher (Thermo Scientific™ Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, #PI32106). Детекцию полос проводили с использованием Chemi-Doc Bio Rad, а интенсивность количественно определяли с помощью программного обеспечения Image Lab Bio Rad. Полученные количественные значения интенсивности полос по белку *Germes* делили на значения, полученные для актина/GapDH в том же образце. По оси *Y* (рис. 1) отложены относительные нормированные уровни для каждой стадии развития.

Для иммуногистохимического анализа связки ооцитов разных стадий фиксировали в смеси метанол/1% формальдегид при -20°C 2 ч. Проводку и иммуноокраску проводили согласно протоколу,

описанному ранее (Chang et al., 2004). Использованные первичные и вторичные антитела и красители: anti-*Germes* (1 : 100), anti-Xpat (1 : 100) (любезно предоставленные Dr H.R. Woodland, University of Warwick), AF 488 anti-rabbit (1 : 200, Invitrogen, #A-11034), AF 594 donkey anti-sheep (1 : 200, Invitrogen, #A-11016), phalloidin (Sigma #P1951), Cy2 donkey anti-rabbit (1 : 100, Jackson ImmunoResearch, AB_2340612), Cy5 anti-mouse (1 : 100, Jackson ImmunoResearch AB_2340820), propidium iodide (Sigma, P4170) и DAPI (Sigma, #D9542). Для достоверности, что между вторичными флуоресцентными антителами нет кросс-реакции, параллельно проводили иммуноокрашивание, при котором в ходе эксперимента исключались первичные антитела. Визуализацию проводили с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 или Olimpus FluoView FV10i.

Для сканирующей электронной микроскопии ооциты, со снятыми двумя способами оболочками, фиксировали в 2.5% глутаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере pH 7.3, постфиксировали в 1% тетроксиде осмия и дегидратировали в этаноле возрастающих концентраций и 100% ацетоне. Образцы анализировали при помощи CamScan S-2 микроскопа.

Для визуализации ППК эмбрионы 29–31 стадий фиксировали в 4% параформальдегиде/PBS при 4°C (ночь). Далее эмбрионы переносили в 0.1% раствор TPBS на 20 мин (PBS-Tween-20), экстраги-

ровали 0.25% Triton X-100 на PBS 30 мин, промывали 3 раза TPBS и инкубировали в блокирующем буфере (10% козья сыворотка на TPBS) при комнатной температуре 2 ч. Образцы обрабатывали anti-Germes антителами 1 : 250 в блокирующем буфере при 4°C 4 дня, промывали буфером TPBS 5 раз и инкубировали с goat anti-rabbit 568 антителами (1 : 200, Sigma, SAB4600310) в блокирующем буфере при 4°C в течение ночи, и затем промывали TPBS 5 раз. Детекцию проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FluoView FV10i.

ПЦР и ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени)

0.5 или 1 мкг тотальной РНК использовали для синтеза кДНК с помощью M-MuLV ревертазы (Fermentas #K1691) по протоколу, рекомендованному производителем. Количество мРНК *germes* определяли с помощью ПЦР-РВ. Нормализацию количества мРНК *germes* проводили по уровням экспрессии мРНК ODC. ПЦР-РВ проводили с помощью 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием системы SYBR Green/ROX. Относительные уровни экспрессии определяли $\Delta\Delta C_t$ методом (Bookout et al., 2006).

Олигонуклеотиды подбирали к последовательностям из базы NCBI GenBank с помощью программы Oligo Analyzer (Integrated DNA technologies). В реакции ПЦР-РВ использовали следующие праймеры (Synthol):

Germes: прямой – AAATGGCAGAATGTACA-CAGG,

обратный – GTGTAGTTATGAATGCAACAGATAA,

ODC (Nandadasa et al., 2009): прямой – GC-CATTGTGAAGACTCTCTCCATTC,

обратный – TTCGGGTGATTCCTTGCCAC.

Специфичный обратный олигонуклеотид для синтеза кДНК *germes* – TGTGCTCAGTGAATCA.

Для оценки наличия интрона 152 пн в несплайсированной форме мРНК *germes* в ооцитах и клетках фолликулярных оболочек с них использовали следующие олигонуклеотиды (Synthol):

прямой – GCAAGACTGGGATGTGAAGGAA-CAAAAT,

обратный – TAAAAAAAATGAAAAACAAAA-TAACT.

ПЦР выполняли с использованием полимеразы КАРА HiFi на амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient (39 циклов).

In situ гибридизация, совмещенная с электронной микроскопией

Для получения плазмиды pCS2+-Germes последовательность ORF Germes была вырезана по рестрикционным сайтам *NcoI*–*NotI* из плазмиды

Germes-pGEMT (Berekelya et al., 2003) и легирована в pCS2+, линейризованную по *StuI* по совместимым концам с потерей рестрикционных сайтов. Конструкт pCS2+-Germes, линейризовали рестриктазой *NotI* и использовали для синтеза дигоксигенин-меченой рибопробы с T7 промотора, используя mMESSAGE mMACHINE T7kit (Ambion/ThermoFisher scientific). В качестве отрицательного контроля использовали рибопробу смысловой последовательности *germes*, синтезированную с SP6 промотора (mMESSAGE mMACHINE SP6 kit Ambion/ThermoFisher scientific). *In situ* гибридизацию с последующей иммуноокраской ультратонких срезов антителами против дигоксигенина, содержащими нанозолото 1 нм (Amersham Biosciences, сняты с продажи), проводили согласно протоколу (Bilinski et al., 2010). Визуализацию образцов проводили с помощью JEM-1011 электронного микроскопа с моделью камеры Gatan ES500W Model 782.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика синтеза белка Germes в ооцитах и зародышах шпорцевой лягушки

Хотя известно, что мРНК *germes* экспрессируется в течение всего оогенеза и раннего развития шпорцевой лягушки, данных о синтезе и локализации белка нет. Поэтому мы поставили цель исследовать наличие белка Germes как в ооцитах, так и в раннем развитии *Xenopus laevis*. Была получена кроличья сыворотка, содержащая поликлональные антитела к растворимой части белка Germes.

С помощью полученных поликлональных анти-Germes антител провели анализ наличия белка Germes в ооцитах и эмбрионах *X. laevis* методом вестерн-блоттинга. Полоса, соответствующая целевому белку, выявляется на уровне примерно 68 кДа, что соответствует предсказанной массе белка (587 ак).

Для получения ооцитов ранних стадий взяли лягушат 5–6 мес. после метаморфоза, яичники которых содержат ооциты до IV стадии роста. Вручную отобрали прозрачные ооциты I–II стадии цитоплазматического роста и пигментированные ооциты IV стадии с оболочками. Белок Germes выявлен в обеих группах ооцитов в сходных количествах (рис. 1а).

Белок Germes появляется в ранних ооцитах (I–II стадии) и сохраняется во время роста ооцитов. Белок присутствует в зиготе, в период дробления, гастрюляции и нейруляции. Далее наблюдается плавное снижение количества белка Germes в зародышах вплоть до последней изученной нами стадии 48, однако он не исчез полностью (рис. 1б).

Для изучения локализации белка в оогенезе были иммуногистохимически окрашены целые фолликулы. Как и РНК-транскрипт, белок также имел диффузное распределение на I–II стадиях

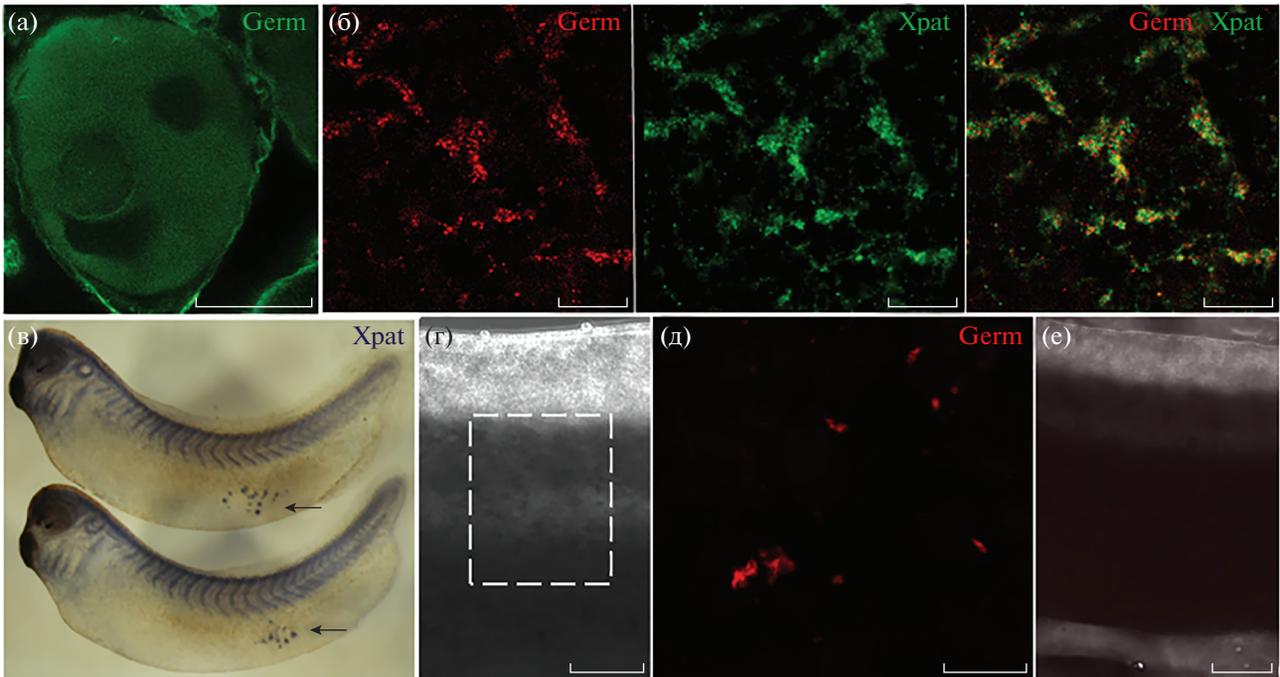


Рис. 2. Иммуноокрашивание на белок *Germes* ооцитов и зародышей в период миграции половых клеток. (а) Ооцит стадии I. Белок *Germes* распределен в цитоплазме ооцита. (б) Ооцит стадии VI. Белок *Germes* локализован в островках ПП вегетативного полюса. Иммуноокрашивание на *Xpat* (красный), *Germes* (зеленый), колокализация (желтый). (в) ППК зародыша на стадии 32, выявленные путем *in situ* гибридизации с зондом к *Xpat* (указаны стрелками). (г) Бок зародыша на стадии 30, рамкой отмечена зона, представленная на рис. (д) (фазовый контраст). (д) Иммуноокрашивание на белок *Germes* выявляет группу мигрирующих первичных половых клеток (z-stack). (е) Иммуноокрашивание преиммунной сывороткой (отрицательный контроль). Масштаб: (а) 25, (б) 10, (г, е) 150, (д) 15 мкм.

ооцитарного роста (рис. 2а) с последующей локализацией в островках с III стадии. Окрашивание ооцитов V–VI стадии антителами против *Germes* также выявило характерные островки половой плазмы (ПП) в вегетативном кортексе. В островках ПП наблюдалась колокализация паттернов окраски антителами против *Germes* и другого маркера половой плазмы *Xpat*, окрашенным специфическими антителами к нему (любезно предоставлены Dr. H.R. Woodland, Warwick University) (рис. 2б). Можно заключить, что мРНК *germes* начинает сразу транслироваться в начале роста ооцитов. Для мРНК маркеров половой плазмы и, в том числе для *germes*, детально изучен способ последующей транспортировки мРНК в вегетативный кортекс ооцита. На II стадии роста около ядра с вегетативного полюса ооцита формируется т.н. митохондриальное облако, в котором локализуются мРНК маркеров. За локализацию мРНК *Germes* отвечают особые последовательности в 3'-нетранслируемой области (Ponomarev et al., 2021). К стадии III облако теряет шаровидную форму и «растекается» на вегетативном полюсе ооцита, а маркеры формируют островки ПП, закрепленные в кортикальном слое. Как осуществляется локализация белков ПП не известно. Однако мы показали, что и белок *Germes* меняет локализацию. Возможно, диффузно распределенный

белок постепенно деградирует, но впоследствии синтезируется вновь с локализованной в островки мРНК. Сделать заключение о длительности периода трансляции и времени жизни белка в оогенезе на основании полученных данных не предоставляется возможным и требует дальнейшего исследования.

При окраске зародышей на стадии хвостовой почки (29–32) антителами против белка *Germes*, на боковой поверхности зародыша выявлялась группа клеток, аналогичная той, что выявляется с помощью гибридизации *in situ* к маркерам ПП (Tarbashevich et al., 2007). На рис. 2в видны группы ППК, визуализированные с зондом к *xpat*. На рис. 2г, 2д иммуноокрашивание на белок *Germes* выявило похожие клетки в той же области зародыша. Сходным образом антителами против других генов ПП (*Nanos* и *Xiwi*) выявляли ППК (Lai et al., 2012). Мы полагаем, что выявленные нами клетки являются первичными половыми и содержат белок *Germes*, хотя мРНК гибридизацией *in situ* уже не выявляется.

Белок Germes в фолликулярных клетках ооцита

Исследуя экспрессию и локализацию белка *Germes* в яичниках шпорцевой лягушки иммуноокрашиванием, мы неожиданно обнаружили, что антитела окрашивают не только ооциты, но и

фолликулярные клетки (ФК) больших и малых фолликулов.

Фолликулярный эпителий однослойный, и его клетки формируют макровиллы (МВ) на поверхности, обращенной к ооциту, для прямой связи с ним (рис. 7а). Антитела к Germes окрашивали не описанные ранее линейные структуры длиной около 5.5 мкм в области контактных зон и перекрывания соседних ФК. Эти структуры обнаружены в фолликулярных клетках ооцитов как малого роста, так и выросших ооцитов (рис. 3а, 3б, 3е, 3ж). Белок обнаружен также в зоне макровилл фолликулярных клеток (рис. 3а, 3в–3е). Окрашенные структуры имели 0.3–0.4 мкм в диаметре. Диаметр макровилл, как они видны в сканирующий микроскоп, совпадает с размерами структур, выявленных антителами против Germes с помощью конфокальной микроскопии (рис. 7а). Способность Germes связываться с легкими цепями динеина (Berekelya et al., 2007) и локализация его в отростках ФК может говорить о его участии в транспортных процессах.

Фолликулярные клетки распластаны по поверхности ооцита, кое-где накрывая друг друга, как черепица (Konduktorova, Luchinskaya, 2013). ФК не являются потомками клеток зародышевой линии, а ведут начало из эпителия формирующейся гонады. Встает очевидный вопрос о происхождении обнаруженного белка Germes в фолликулярной оболочке. Возможные варианты – это транспорт белка или мРНК *germes* из ооцита в ФК с последующей трансляцией, либо экспрессия и трансляция в самих ФК.

Исследование экспрессии мРНК *germes* в ФК

Синтез РНК *germes* в ооцитах начинается в яичниках *Xenopus* уже к концу метаморфоза (стадии 65–66). Яичник уже имеет дольчатую структуру, в дольках идет формирование цист и ооцитов I порядка (рис. 4). мРНК *germes* распределена в виде проксимально-дистального градиента в дольке яичника. Такое градиентное распределение объяснимо, т.к. при росте дольки в дистальной части находятся более зрелые ооциты (Coggins, 1973). Затем картина локализации и экспрессии мРНК *germes*, выявленная при помощи *in situ* гибридизации на всех стадиях оогенеза, характерна для поведения маркеров половой плазмы, что мы установили ранее (Berekelya, 2003).

Качественный анализ экспрессии РНК *germes* в ФК проводили с помощью варианта метода *in situ* гибридизации, при котором РНК детектируется в результате хромогенной реакции со щелочной фосфатазой. На парафиновых срезах фолликулярные клетки окрашены темно-сиреневым цветом, однако малая толщина фолликулярных клеток всего 0.7–1 мкм (Konduktorova, Luchinskaya, 2013), не позволяла точнее исследовать локализацию зонда (data not shown).

Электронная микроскопия фолликулов, подвергнутых *in situ* гибридизации с зондом к *germes* с последующим окрашиванием антителами с коллоидным золотом (1 нм), позволила уточнить локализацию РНК в ФК и ооцитах. Золотая метка, обнаруженная в островках половой плазмы на вегетативном полюсе ооцита на V–VI стадии, а также по всему объему малых ооцитов стадий II–III (рис. 5а, 5б) служила доказательством успешно прошедшей гибридизации и окраски антителами с коллоидным золотом. В перинуклеарной области ооцитов II–III стадий, зоне, где формируется митохондриальное облако, метка была особенно массовой. Частицы коллоидного золота были обнаружены в пространстве между ооцитом и фолликулярными клетками, в зоне макро- и микровилл на вегетативном полюсе, а также в ядрах и цитоплазме самих ФК как больших, так и малых фолликулов (рис. 5г–5е). Причем отмечено, что плотность частиц коллоидного золота на срезе внутри фолликулярной клетки выше, чем поблизости в ПП или цитоплазме ооцита. Это наблюдение подтвердит результаты оценки удельного содержания мРНК *germes* в тонком фолликулярном слое клеток к содержанию в ооците. В соединительнотканной теке, как и ожидалось, РНК *germes* обнаружена не была.

Количественное соотношение мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных оболочках

Было проведено сравнение относительного количества содержания мРНК *germes* в двух группах ооцитов стадий I–III и стадий V–VI и фолликулярных оболочек с них. Ооциты I–III стадий и фолликулярные оболочки получали из яичников взрослых лягушек, разделяя их путем инкубации с коллагеназой. С ооцитов V–VI стадий из яичников половозрелых лягушек оболочки снимали вручную. Полученные двумя способами препараты оболочек для последующего ПЦР-РВ помимо фолликулярных клеток содержали клетки теки. Однако ранее ни методом *in situ* гибридизации, ни иммуноокрашиванием на белок Germes экспрессию в клетках теки зарегистрировать не удалось.

Результаты, полученные методом ПЦР-РВ подтвердили наличие транскрипта мРНК *germes* в фолликулярных клетках (рис. 6). Содержание мРНК *germes* в фолликулярном слое было сопоставимо с уровнем в ооцитах V–VI стадий, а количество транскрипта в ФК малых ооцитов превышало количество в самих ооцитах примерно в 3 раза.

Для оценки качества снятия оболочек, мы проанализировали поверхность ооцита с использованием сканирующего микроскопа. Выяснилось, что при мануальном снятии может остаться до трети слоя фолликулярных клеток на поверхности ооцитов V–VI стадий (рис. 7б), тогда как с помощью коллагеназы фолликулярные оболочки отделяются полностью (рис. 7в).

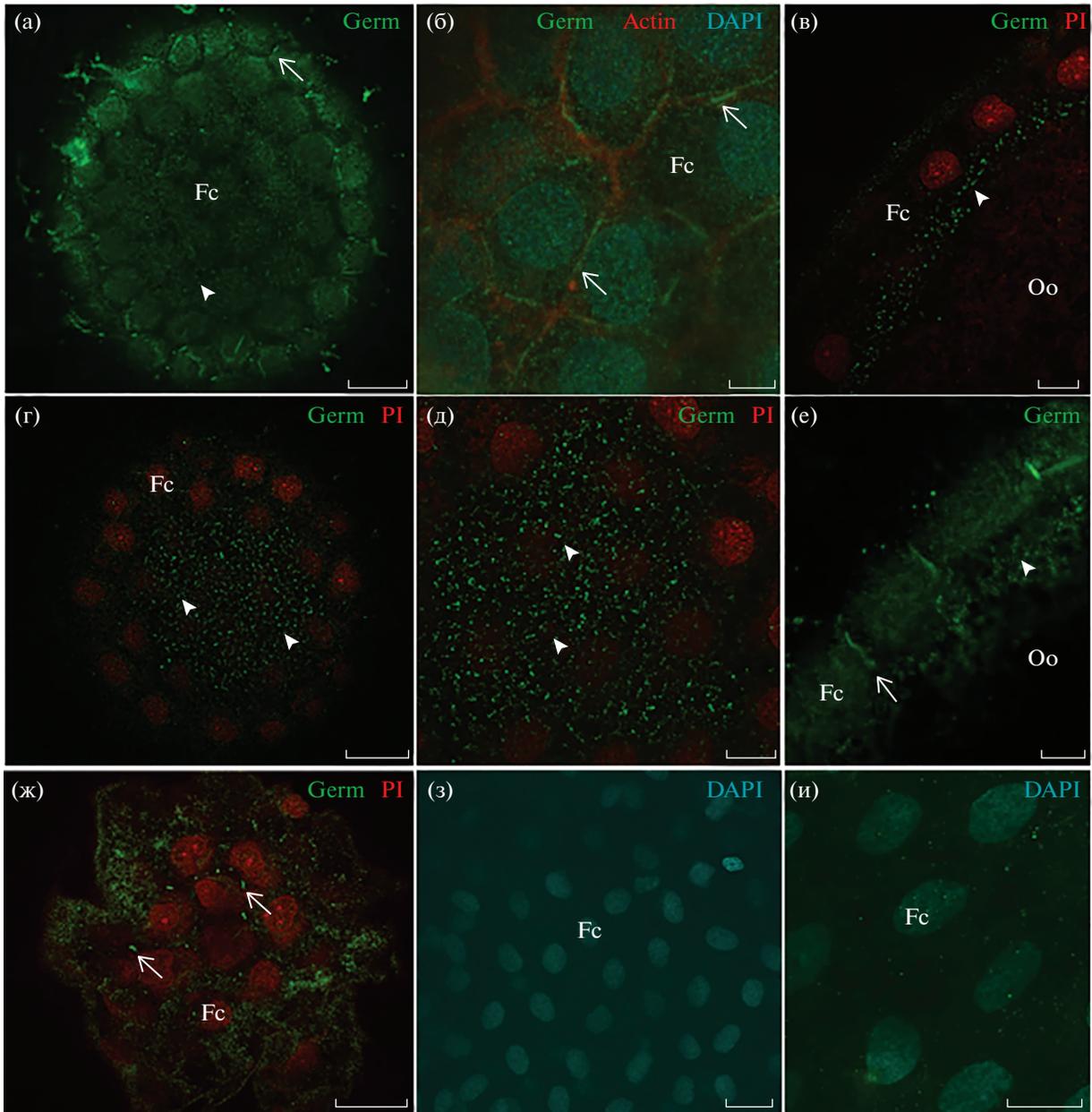


Рис. 3. Иммуноокрашивание на белок *Germes* фолликулярных клеток. (а, б, г, д) Ооцит стадии V–VI. (а, б) Оптический срез фолликулярных клеток. Белок *Germes* (зеленый) обнаруживается в виде линейных структур в контактных зонах соседних фолликулярных клеток (острая стрелка), где колокализуется с F-актином (phalloidin-красный); ядра окрашены DAPI (голубой). (г, д) Макровиллы на поверхности фолликулярных клеток (треугольная стрелка), обращенной к ооциту, содержат *Germes*. Ядра окрашены progridium iodide (PI-красный). (в, е) На поперечном оптическом срезе белок *Germes* обнаруживается в контактных зонах соседних фолликулярных клеток, а также в области макровилл. (ж) Ооцит стадии I–II. Начало образования линейных структур в контактных зонах. (з, и) Отрицательный контроль с преиmunной сывороткой (и), а также отрицательный контроль на вторичные антитела (з). Fc – фолликулярные клетки, Oo-ооцит. Масштаб: (а, г, ж) 25, (д, в, и) 10, (б, е) 5, (з) 15 мкм.

Если учесть, что лизат ооцитов большого роста содержит некоторое количество ФК, то можно заключить, что экспрессия *germes* ФК превышает экспрессию в ооцитах еще значительно. Таким образом, метод ПЦР-РВ подтвердил результаты *in situ* гибридизации о наличии мРНК маркера клеток половой линии в фолликулярных клетках, имеющих соматическое мезодермальное происхождение.

Экспрессия genes в фолликулярных клетках

При помощи *in situ* гибридизации на целых эмбрионах, совмещенной с электронной микроскопией, было показано наличие РНК *germes* не только в цитоплазме и зоне отростков ФК, но и в ядре, что с высокой долей вероятности указывало на синтез этой РНК именно фолликулярными клетка-

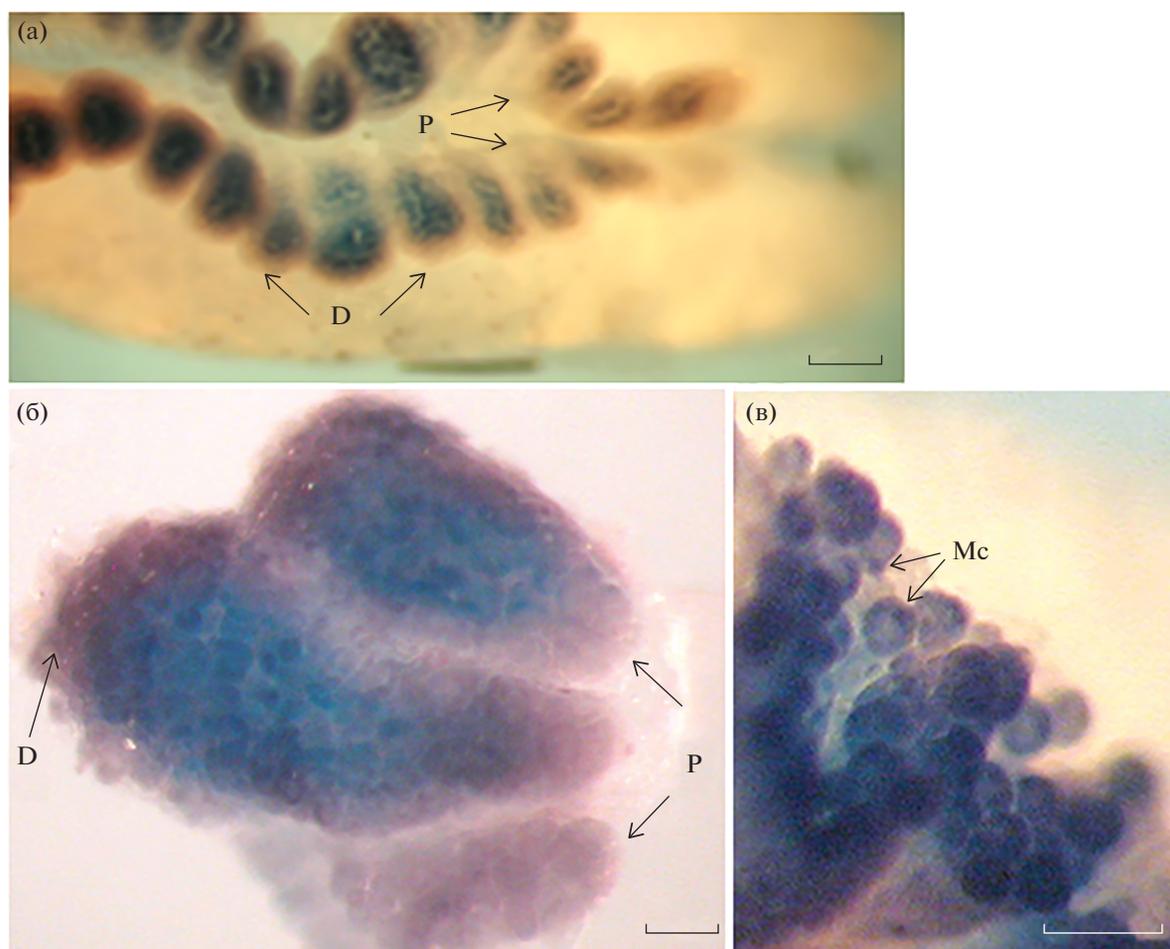


Рис. 4. Проксимо-дистальное градиентное распределение мРНК *germes* в яичнике шпорцевой лягушки стадии 66 (конец метаморфоза), выявленное путем *in situ* гибридизации. (а) Растущий яичник, лежащий на почке. Оо – ооциты, Р – проксимальная часть, D – дистальная часть. (б, в) Дольки яичника. В проксимальной части экспрессия мРНК *germes* отсутствует, в дистальной части видно начало локализации диффузно распределенной мРНК в митохондриальное облако (Mc). Масштаб: (а) 6000; (б, в) 1000 мкм.

ми. Однако этот неожиданный результат требовал дополнительных доказательств, поскольку ни для одного специфического маркера половой плазмы не показана экспрессия в ткани яичника. При экспрессии лизат ФК должен содержать непротранскрибированную РНК, содержащую интроны, что можно было проверить. Для этого в геномной последовательности *germes* был выбран короткий интрон длиной 152 пн. Для качественной оценки наличия РНК *germes* при помощи ПЦР использовались следующие праймеры: прямой олигонуклеотид, комплементарный концу последовательности экзона, обратный – концу последовательности интрона (рис. 8а). По присутствию ПЦР-продукта длиной 219 пн можно судить о наличии данного интрона в непротранскрибированной мРНК из лизатов ооцитов малого и большого роста и фолликулярных оболочек с них. Для контроля ложноположительного результата с гДНК использовались образцы тотальной РНК из ФК в пересчете на то же коли-

чество кДНК, которое использовалось для постановки ПЦР-реакции.

Наличие непротранскрибированной мРНК, содержащей последовательность интрона, удалось показать в лизатах фолликулярных оболочек как больших, так и малых ооцитов, а в самих ооцитах только малого роста (рис. 8б). Отсюда следует, транскрипция мРНК *germes* растущих ооцитов короткая, только в течение I–II стадий роста. В ооцитах большого роста РНК сохраняется, но не транскрибируется.

Обнаружение непротранскрибированной РНК *germes* в фолликулярных клетках больших и маленьких фолликулов доказывает экспрессию маркера половой плазмы *germes* в них на протяжении всего оогенеза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на длительное исследование генов ПП пока довольно мало сведений о трансляции

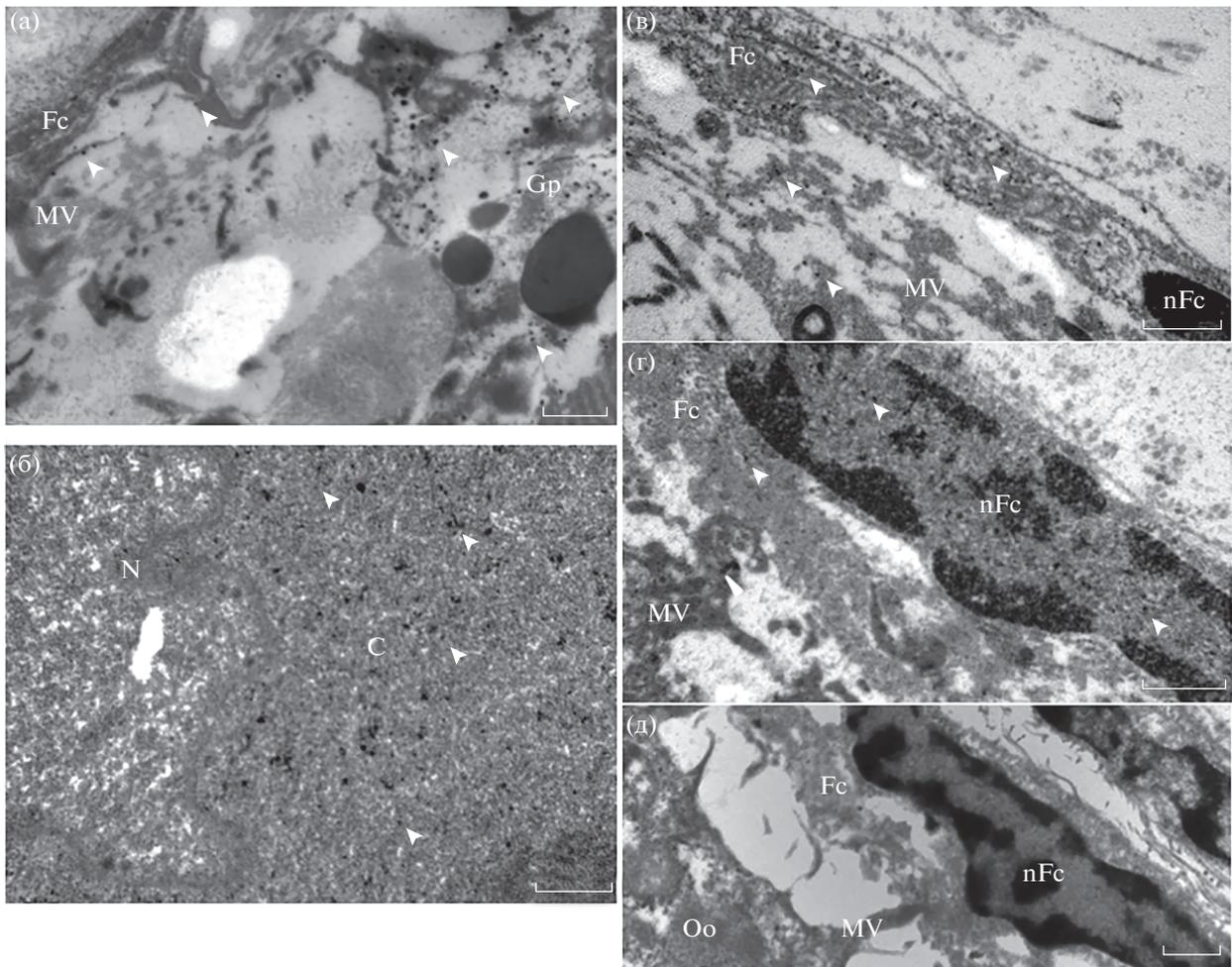


Рис. 5. Гибридизация *in situ* с зондом к мРНК *germes* с окраской ультратонких срезов антителами, меченными наночастицами золота. (а) Вегетативный полюс ооцита стадии VI. Транскрипт-Ау – в половой плазме (Gr) и макровиллях (MV). (б) Граница ядра (N) и цитоплазмы (C) малого ооцита стадии II в процессе формирования митохондриального облака. Транскрипт-Ау в околоядерной цитоплазме. (в, г) Фолликулярная оболочка ооцита стадии VI. Транскрипт-Ау в цитоплазме фолликулярной клетки (Fc) и макровиллях (MV) (в), а также в ядре (nFc) (г). (д) Отрицательный контроль с использованием смыслового зонда *germes*. Масштаб: 0.5 мкм.

эндогенных белков во время роста ооцитов и раннего развития эмбрионов.

В нашей работе были получены кроличьи поликлональные антитела против белка *Germes*, с помощью которых исследована трансляция белка в течение всего оогенеза и развития до личиночной стадии. Белок был обнаружен в ооцитах на протяжении всего оогенеза. Белок локализовался в ранних ооцитах диффузно, в ооцитах поздних стадий в вегетативном кортексе в составе ПП. Сравнение количества белка в ооцитах малого и большого роста с помощью вестерн-блоттинга при нормировании по актину не показало существенных различий. Однако, следует учесть, что объем ооцитов на исследованных стадиях возрастает в 40–200 раз, что скорее всего ведет к увеличению содержания актина. Сохранение отношения количества белка *Germes* к актину указывает на продолжение трансляции *Germes* в процессе

большого роста ооцитов. Со стадии зиготы до конца гаструляции количество белка сохранялось, как это было в предыдущий период. Возможно, вместе с компактизацией гранул ПП на вегетативном полюсе после оплодотворения и образованием крупных агрегатов трансляция белка снижается или прекращается вовсе. Агрегаты половой плазмы при дроблении зиготы распределяются случайно и попадают в несколько клеток-предшественников клона первичных половых клеток. Количество ППК на стадии миграции может различаться на правой и левой половине одного зародыша, а также варьировать от зародыша к зародышу. По-видимому, белок *Germes* сохраняется только в этих клетках. Это может объяснять вариабельность полученных относительных значений белка после вестерн-блоттинга на последовательных стадиях развития.

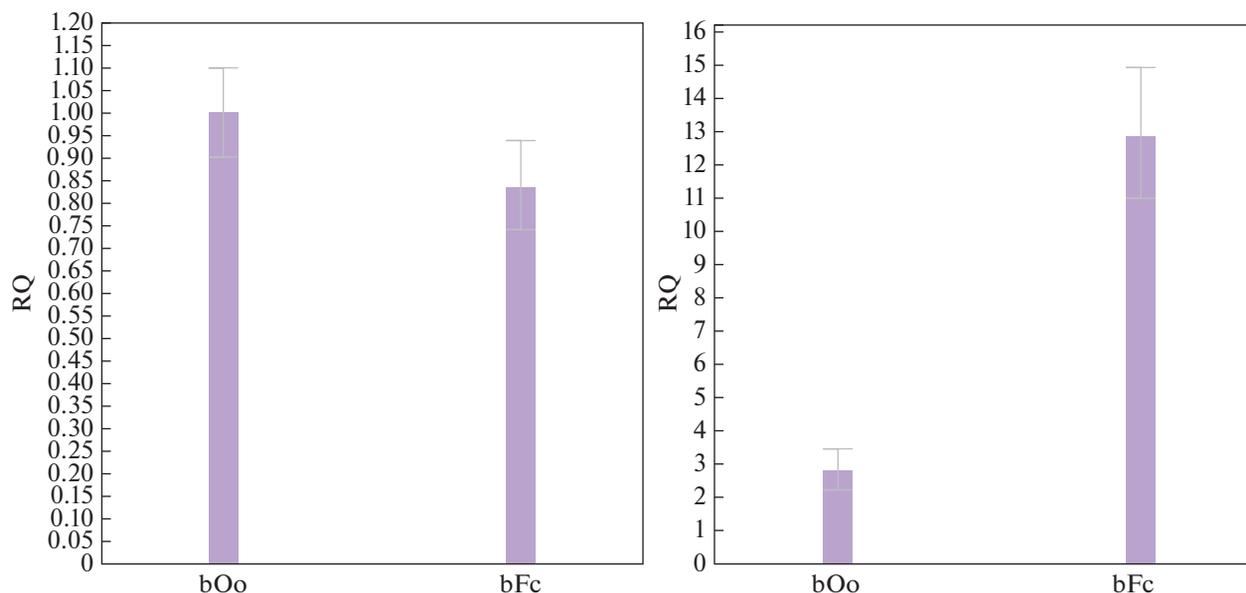


Рис. 6. Относительные уровни экспрессии мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках, полученные с помощью ПЦР-РВ. Относительные уровни экспрессии (RQ) рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta Ct$. В качестве референсного гена использовали ODC. Экспрессия в ооцитах стадии V–VI (bOo) принята за 1. bOo – ооциты стадии V–VI, bFc – фолликулярные оболочки с ооцитами стадии V–VI, sOo – ооциты стадии I–III, SFc – фолликулярные оболочки с ооцитами I–III.

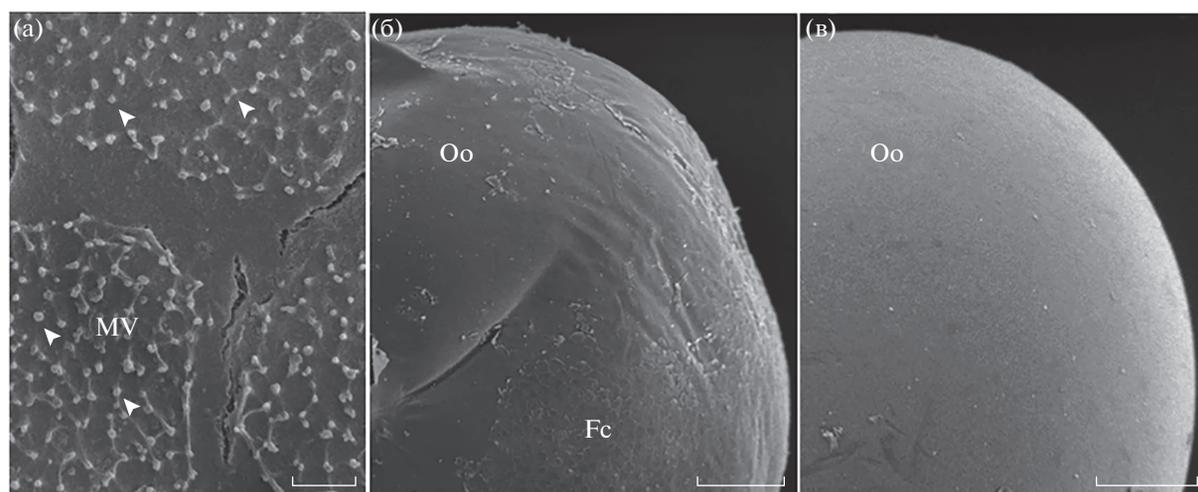


Рис. 7. Сканирующая электронная микроскопия поверхности ооцита стадии IV–V и фолликулярных оболочек ооцита. (а) Макровилли (MV) на поверхности фолликулярных клеток, обращенной к ооциту (указаны стрелкой). (б) Ооцит после мануального снятия оболочек. Фолликулярный слой (Fc) частично сохраняется на поверхности. в. Коллагеназа полностью снимает фолликулярные клетки с поверхности ооцита. Масштаб: (а) 3, (б, в) 150 мкм.

Перед гаструляцией ПП в первичных половых клетках, в ее составе и мРНК *germes*, меняет свою локализацию с полярной гранулярной на диффузную околюдерную (Butler et al., 2017). Ранее нами было показано, что такая транслокация идет с участием *Germes* (Berekelya et al., 2007; Yamaguchi et al., 2013). Транслокация предшествует появлению способности к активной миграции ППК.

Неожиданным оказалось обнаружение белка *Germes* в окружающих ооцит фолликулярных

клетках на всех стадиях роста. ФК образуются из эпителиального компартамента формирующегося яичника лягушки, а потому их происхождение никак не связано с половой линией. Ни для одного из генов ПП до настоящего времени не была установлена экспрессия в ФК. Белок может быть транслирован внутри ФК, либо транспортироваться из ооцита. Дополнительные эксперименты выявили наличие мРНК *germes* в фолликулярных оболочках малых и больших ооцитов, причем

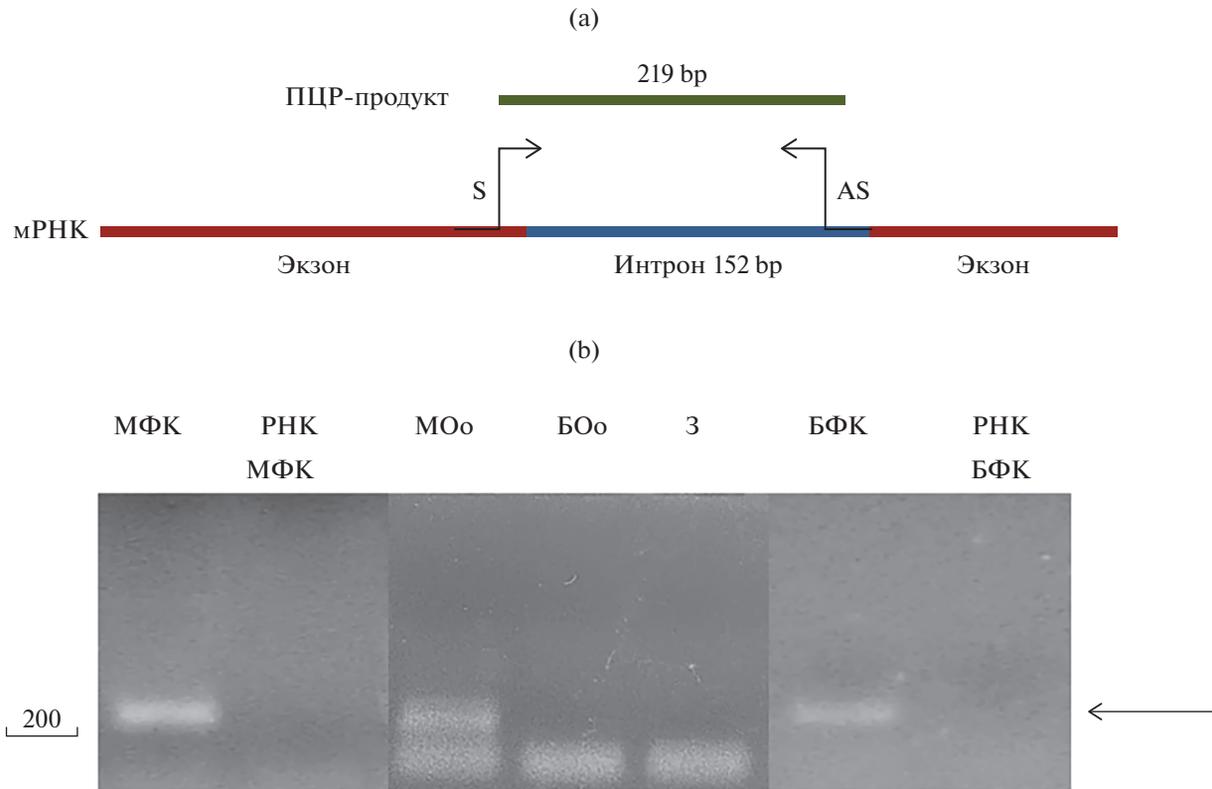


Рис. 8. Выявление непроецессированной мРНК *germes* в ооцитах и фолликулярных клетках с них с помощью ПЦР. (а) Схема расположения экзонов и интрона в последовательности *germes* и схема подбора олигонуклеотидов (S, AS) для эксперимента. (б) Методом ПЦР показано наличие интрона в составе тотальной мРНК. Нпроецессированная мРНК обнаружена в фолликулярных оболочках как больших (bFc), так и малых ооцитов (sFc), а в ооцитах только малого роста (sOo). Стрелкой указано положение ПЦР-продукта. sOo – ооциты стадии I–III, bOo – ооциты V–VI стадии, Z – зрелые неоплодотворенные ооциты, RNA sFc и RNA bFc – отрицательный контроль для исключения контаминации геномной ДНК образцов тотальной РНК фолликулярных клеток малых и больших ооцитов.

удельное содержание мРНК в ФК с малых ооцитов в 3 раза превышало содержание мРНК в них. Количество мРНК в больших ооцитах и ФК с них сходно.

Далее была исследована локализация обнаруженной мРНК *germes* с помощью *in situ* гибридизации, совмещенной с электронной микроскопией. Транскрипт был обнаружен в ядре, цитоплазме и зоне макро- и микровиллей. Точку в доказательстве экспрессии *germes* фолликулярными клетками поставило обнаружение непроецессированной формы мРНК в ФК на протяжении всего оогенеза.

Выяснилось также, что транскрипция *germes* в самих ооцитах непродолжительная и заканчивается к III стадии. Таким образом, выявляемая методом гибридизации *in situ* мРНК *germes*, которую мы видим в кортексе на вегетативном полюсе и ПП при дроблении и гаструляции была синтезирована еще в ооцитах I–II стадии и сохранялась на протяжении нескольких месяцев.

Функция *Germes* в составе ПП остается до конца неясной. мРНК *germes* содержит в 3'-НТО мотивы локализации в митохондриальное облако (Ponomarev et al., 2021), а белковая последова-

тельность имеет мотивы белок-белкового связывания лейциновые молнии, кальций-связывающий домен, а также мотив связывания с легкими цепями динеина в С-концевой области (Berekelya, 2007). Легкие цепи могут входить в комплекс динеинового мотора, или связываться напрямую с другими белками, функция которых не связана с моторами цитоскелета, и просто регулировать взаимодействие белков (Rapali et al., 2011). Отсюда можно предположить участие *Germes* в процессах транспорта. Окрашивание белка *Germes*, выявленного антителами, в зоне макровиллей, а также в приграничных зонах самих ФК может служить подтверждением этого. Нарушение транслокации ПП, содержащей специфические РНК и белки в околоядерную область предшественников ППК на стадии гаструлы при оверэкспрессии как нативной, так и мутантных форм *Germes* также подтверждает предположение о транспортной функции белка (Berekelya et al., 2007). Для ФК транспортные функции являются одной из важнейших, однако в каких процессах может участвовать *Germes*, можно пока только гадать. Чем индуцируется транскрипция и трансляция белка в ооцитах и фолликуляр-

ных клетках – вопрос пока также открытый. Недавно было показано, что *Sox7* может напрямую влиять на экспрессию *Germes* (Butler et al., 2018). Является ли *Sox7* индуктором экспрессии *Germes*, пока неизвестно.

БЛАГОДАРНОСТИ

JEM-1011 microscope with a Gatan ES500W Model 782 camera на базе ЦКП МГУ представлен при финансовой поддержке министерства образования и науки РФ.

Авторы выражают огромную благодарность проф. H.R. Woodland (Warwick University, UK) за методическую помощь, ценные советы и консультации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госНИР кафедры эмбриологии МГУ № 30-2-21.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания и эвтаназии соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Виктория Кондукторова выполнила большую часть экспериментов. Все авторы участвовали в планировании экспериментов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов. Виктория Кондукторова и Наталья Лучинская участвовали в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berekelya L.A., Ponomarev M.B., Luchinskaya N.N. et al.* *Xenopus* *Germes* encodes a novel germ plasm-associated transcript // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. P. 521–524.
- Berekelya L.A., Mikryukov A.A., Luchinskaya N.N. et al.* The protein encoded by the germ plasm RNA *Germes* associates with dynein light chains and functions in *Xenopus* germline development // *Differentiation*. 2007. V. 75. № 6. P. 546–558.
- Bilinski S.M., Jaglarz M.K., Dougherty M.T. et al.* Electron microscopy, immunostaining, cytoskeleton visualization, in situ hybridization, and three-dimensional reconstruction of *Xenopus* oocytes // *Methods*. 2010. V. 51(1). P. 11–19.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J. et al.* High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR // *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2006. Ch. 15. U. 15.8.
- Butler A.M., Aguero T., Newman K.M. et al.* Primordial germ cell isolation from *Xenopus laevis* embryos // *Methods Mol. Biol*. 2017. V. 1463. P. 115–124.
- Butler A.M., Owens D.A., Wang L. et al.* A novel role for *sox7* in *Xenopus* early primordial germ cell development: mining the PGC transcriptome // *Development*. 2018. V. 145. № 1.
- Chan A.P., Kloc M., Bilinski S. et al.* The vegetally localized mRNA *fatvg* is associated with the germ plasm in the early embryo and is later expressed in the fat body // *Mech. Dev*. 2001. V. 100. P. 137–140.
- Chang P., Torres J., Lewis R.A. et al.* Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 4669–4681.
- Coggins L.W.* An ultrastructure and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis* // *J. Cell. Sci*. 1973. V. 12. P. 71–93.
- Colozza G., De Robertis E.M.* Maternal syntabulin is required for dorsal axis formation and is a germ plasm component in *Xenopus* // *Differentiation*. 2014. V. 88. № 1. P. 17–26.
- Cuykendall T.N., Houston D.W.* Identification of germ plasm-associated transcripts by microarray analysis of *Xenopus* vegetal cortex RNA // *Dev. Dyn*. 2010. V. 239. № 6. P. 1838–1848.
- Houston D.W., Zhang J., Maines J.Z. et al.* A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* *boule* // *Development*. 1998. V. 125. P. 171–180.
- Hudson C., Woodland H.R.* Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis* // *Mech. Dev*. 1998. V. 73. P. 190–198.
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L. et al.* Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins // *Protein Expr Purif*. 2006. V. 48(1). P. 14–23.
- Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N.* Follicular cells of the amphibian ovary: Origin, structure, and functions // *Russ. J. Dev. Biol*. 2013. V. 44. P. 232–244.
- Lai F., Singh A., King M.L.* *Xenopus* *Nanos1* is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells // *Development*. 2012. V. 139. P. 1476–1486.
- Liu Y., Ren L., Ge L. et al.* A strategy for fusion expression and preparation of functional glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue by introducing an enterokinase cleavage site // *Biotechnol. Lett*. 2014. V. 36(8). P. 1675–1680.
- MacArthur H., Houston D.W., Bubunenko M. et al.* DEADSouth is a germ-plasm-specific DEADbox RNA helicase in *Xenopus* related to eIF4A // *Mech. Dev*. 2000. V. 95. P. 291–295.
- Machado R.J., Moore W., Hames R. et al.* *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning // *Dev. Biol*. 2005. V. 287. P. 289–300.
- Mosquera L., Forristall C., Zhou Y. et al.* A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger // *Development*. 1993. V. 117. P. 377–386.
- Nandadasa S., Tao Q., Menon N.R. et al.* N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly

- and morphogenetic movements // *Development*. 2009. V. 136(8). P. 1327–1338.
- Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. I. Characterisation and timing of cellular changes at the midblastula stage // *Cell*. 1982. V. 30. P. 675–686.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland, 1956.
- Ogielska M., Kotusz A. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in Anuran amphibians // *J. Morphol.* 2004. V. 259. P. 41–54.
- Pannese M., Cagliani R., Pardini C.L. et al. Xotx1 maternal transcripts are vegetally localized in *Xenopus laevis* oocytes // *Mech. Dev.* 2000. V. 90. P. 111–114.
- Ponomarev M.B., Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N. et al. Localization of *Germes* RNA in *Xenopus* oocytes // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. P. 1–8.
- Rapali P., García-Mayoral M.F., Martínez-Moreno M. et al. LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 414(3). P. 493–498.
- Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 2001.
- Tarbashevich K., Koebnick K., Pieler T. TXGRIP2.1 is encoded by a vegetally localizing, maternal mRNA and functions in germ cell development and anteroposterior PGC positioning in *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.* 2007. V. 311. № 2. P. 554–565.
- Wang J., Bing X., Yu K. et al. Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015. V. 111. P. 109–116.
- Weidinger G., Stebler J., Slanchev K. et al. Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. № 16. P. 1429–1434.
- Yamaguchi T., Taguchi A., Watanabe K. et al. DEADSouth protein localizes to germ plasm and is required for the development of primordial germ cells in *Xenopus laevis* // *Biol. Open.* 2013. V. 15. № 2(2). P. 191–199.
- Yang J., Aguero T., King M. L. The *Xenopus* maternal-to-zygotic transition from the perspective of the germline // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2015. V. 113. P. 271–303.
- Zearfoss N.R., Chan A.P., Wu C.F. et al. Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.* 2004. V. 267. № 1. P. 60–71.
- Zhang J., King M.L. *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning // *Development*. 1996. V. 122. P. 4119–4129.

The Expression of Germ Plasm Gene *Germes* in Follicular Cells of *X. laevis* Oocyte

V. V. Konduktorova^{1,*}, N. N. Luchinskaya¹, and A. V. Belyavsky²

¹Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: virgo584@yandex.ru

During *X. laevis* oogenesis, most of the mRNA transcripts are localized at the vegetal pole in a special region called germ plasm. Germ plasm plays an essential and necessary role in the specification of primordial germ cells. *Germes* presents this maternal mRNA, and has been previously characterized as an early marker of primordial germ cells. We continued our study and characterized the spatial dynamics of *Germes* protein synthesis in the ovaries and early *X. laevis* development using the immune serum we obtained. By immunohistochemistry method we found that, the protein is also localized in the follicular cells surrounding the growing oocytes. Detailed analysis of *germes* mRNA localization in follicular cells was performed by *in situ* hybridization of whole follicles followed by staining with antibodies labeled with colloidal gold. The transcript was found in the space between the oocyte and follicular cells, as well as in the cytoplasm and nuclei of the follicular cells themselves, both large and small follicles. After comparing *germes* expression levels in oocytes and follicular cells we conclude, that amount in follicular cells from small oocytes was exceeded the content of the transcript in the oocytes themselves. The same level *germes* expression was observed both in late stages of oocytes and in follicular cells. The presence of unprocessed mRNA in the follicular layer proved that the cells themselves express *germes* throughout oogenesis.

Keywords: *Xenopus* oocytes, germ plasm, follicular cells, *germes*, electron microscopy *in situ* hybridization, immunohistochemistry

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ПЕРИОДОВ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА ОТ ГОЛОПЛОИДНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДНК В АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМАХ КОРНЕЙ

© 2022 г. Н. В. Жуковская^а, *, В. Б. Иванов^а, **

^а Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276 Россия

*e-mail: nataliazhukovskaya@mail.ru

**e-mail: ivanov_vb@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2022 г.

После доработки 22.06.2022 г.

Принята к публикации 01.07.2022 г.

Анализируется зависимость продолжительности отдельных периодов митотического цикла от голоплоидного содержания ДНК, числа хромосом и среднего количества ДНК на одну хромосому для 64 видов. У диплоидов продолжительность митотического цикла и его периодов T_S и T_{G1} возрастала с увеличением голоплоидного содержания ДНК, а слабое возрастание продолжительности митоза и периода T_{G2} было недостоверным. Продолжительность суммы длительностей периодов T_{G1} , T_{G2} и митоза T_M возрастала с увеличением голоплоидного содержания ДНК, но не так резко, как всего цикла. У представителей порядков Asparalales и Liliales, отличающихся от других видов значительно большим голоплоидным содержанием ДНК и продолжительностями митотических циклов, эти корреляции были более выраженными и у них это наблюдалось для продолжительностей митоза T_M и периода T_{G2} . У полиплоидов, не относящихся к порядкам Asparalales и Liliales, только продолжительность митоза T_M слабо зависела от голоплоидного содержания ДНК, тогда как зависимости продолжительности всего цикла и его периодов не наблюдалось. Для полиплоидов видов из Asparalales и Liliales нет данных.

Ключевые слова: митотический цикл, периоды, голоплоидное содержание ДНК, корень

DOI: 10.31857/S047514502205007X

ВВЕДЕНИЕ

При изучении разных видов было показано, что продолжительность митотических циклов (T_C) в апикальных меристемах корней возрастает с увеличением голоплоидного содержания ДНК (C_{val}). Впервые на это обратили внимание Van't Hof и Sparrow (1963), изучив корни 6 видов, что с увеличением C_{val} возрастает T_C . Потом это было подтверждено, как при изучении нескольких видов в одной лаборатории (Van't Hof, 1965; Evans, Rees, 1971; Nagl, 1974, 1978; Davies, Rees, 1975; Kidd et al. 1987; Olszewska et al., 1989), так и при сравнении результатов разных исследователей для отдельных видов при одной и той же температуре (Иванов 1978, 2011; Francis et al. 2008, Šimová, Herben, 2011). Такие исследования проводились на различных видах однодольных и двудольных травянистых покрытосеменных, среди которых следует выделить растения с преимущественно большим содержанием ДНК из порядков Asparagales и Liliales, у которых продолжительность митотических циклов значительно длиннее, чем у других растений.

Удлинение цикла с увеличением C_{val} рассматривается как одно из проявлений нуклеотипического эффекта, который выражается в том, что с увеличением C_{val} происходит удлинение митотических циклов, продолжительности митоза и мейоза, минимальной продолжительности генеративного периода и интенсивности различных физиологических процессов (Bennett, 1971, Иванов, 1978, Шереметьев и др., 2011, Greilhuber, Leitch, 2012).

Механизм удлинения митотического цикла с увеличением C_{val} нельзя считать выясненным, несмотря на предложенные гипотезы (Francis et al., 2008).

Остается мало изученным происходит ли удлинение цикла с увеличением C_{val} только ли в результате удлинения S-периода (T_S) периода или удлинения и других периодов митотического цикла (T_{G1} и T_{G2}). Решение этой задачи было целью данной статьи. Эта проблема остается пока еще мало изученной.

Van't Hof (1965) показал четкую зависимость от C_{val} продолжительности T_S периода в корнях

7 видов (*Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium tuberosum*, *Crepis capillaris*, *Impatiens balsamina*, *Lycopersicon esculentum*, *Tradescantia paludosa*). Анализ данных этой статьи показал, что продолжительность остальных периодов цикла слабее коррелировала с величиной C_{val} . Evans et al. (1972), изучив 17 видов (при этом сюда входили 5 видов, которые исследовал Van't Hof), показали, что с увеличением C_{val} , T_C возрастает резче, чем продолжительность периода T_S . Они не обнаружили корреляции между продолжительностями цикла и продолжительностью периода T_{G1} и T_S . Kidd et al. (1987) изучив циклы в корнях 8 видов (*Aegilops umbellulate*, *Hordeum vulgare*, *Oryza saliva*, *Pennisetum americanum*, *Secale cereale*, *Tulipa kaufmanniana*, *Trilicum monococcum*, *Zea mays*), показали, что продолжительность T_S периода коррелирует с C_{val} , а продолжительности T_{G1} и T_{G2} периодов не коррелируют. Однако, они обращают внимание на то, что у 7 из изученных видов, не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales T_C были близки (10–14 ч) и значения C_{val} были от 0.4 до 8.6 пг. У них не было достоверной корреляции между продолжительностью T_S периодом и C_{val} . У одного вида, относящегося к порядку Asparagales, *Tulipa kaufmanniana* T_C была значительно длиннее (22.6 ч), а значение C_{val} 22.6 пг. Именно этот один вид обеспечивает наличие заметной корреляции между продолжительностью T_S и C_{val} . Однако, продолжительности периодов T_{G1} и T_{G2} даже для всех видов не зависели от C_{val} . Šímová и др. (2011) не обнаружили корреляций между T_{G1} и T_{G2} периодами, проанализировав опубликованные данные для 7 видов, но нашли корреляцию между T_S периодом и C_{val} , сопоставив опубликованные данные для 21 вида. Mickelson-Young и др. (2016) на нескольких видах показали, что длительность T_S периода возрастала с увеличением C_{val} , но не так резко, как содержание ДНК. Они предположили, репликация ДНК происходит в отдельных репликациях, многие из которых могут воспроизводиться одновременно. Поэтому продолжительность T_S периода может не сильно зависеть от размера генома.

Таким образом, опубликованные данные не многочисленны и не дают однозначного ответа на вопрос о том, как зависят продолжительности отдельных периодов митотического цикла от C_{val} .

В данной статье анализируется зависимость продолжительности отдельных периодов митотического цикла от C_{val} . Зависимость T_C от C_{val} изучена при анализе опубликованных данных для 64 видов, что позволяет более определенно оценить зависимость продолжительности отдельных периодов цикла от C_{val} . Кроме того, эти данные позволяют проанализировать корреляции между продолжительностью отдельных периодов митотического цикла в апикальных меристемах кор-

ней. В статье анализируется также, как зависят продолжительности отдельных периодов цикла от числа хромосом (N_{chr}) и среднего количества ДНК на одну хромосому (C_{val}/N_{chr}), что ранее не изучалось. Шереметьев и др. (2011) обратили внимание на то, что анализ зависимости T_C от C_{val} , как это было сделано Francis et al., 2008 не удачен, и более правильно искать корреляции между продолжительностью цикла и средним содержанием ДНК в хромосоме, что ранее никем не было сделано.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье анализируются опубликованные данные о продолжительности митотических циклов (T_C), полученных тимидиновым методом при анализе кривых меченых митозов, и их отдельных периодов в апикальных меристемах корней разных видов при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Данные представлены в табл. 1. В нее включены данные для видов, у которых кроме T_C была бы определена продолжительность хотя бы одного периода цикла. Для некоторых видов имеются данные нескольких независимых определений. В этих случаях в табл. 1 даны средние значения. В подавляющем большинстве случаев результаты расходятся незначительно в пределах 10–15%, что близко к точности отдельных определений (анализ их разброса дан нами в статье Zhukovskaya et al., 2018). В табл. 1 также приведены также данные о C_{val} , числе хромосом и плоидности, которые были взяты из Plant Cvalue base data (Leitch et al., 2019), издаваемой Ботаническим садом Кью (Англия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продолжительность митотических циклов и их периодов. В табл. 2 представлены данные о том, как варьируют в апикальных меристемах корней разных видов продолжительности всего цикла (T_C), митоза (T_M) отдельных периодов цикла (T_{G1} , T_S , T_{G2}). Величины T_C и C_{val} существенно выше у изученных представителей порядков Asparagales и Liliales, чем у видов из других семейств. Об этом можно судить на основании всех опубликованных данных о T_C (Grif et al., 2002; Francis et al., 2008) и C_{val} (Leitch et al., 2019). Это подтверждают и наши неопубликованные данные. Кроме того, возрастание T_C и увеличением C_{val} происходит более резко при больших значениях C_{val} , чем при более низких, наблюдающихся у остальных изученных растений. Это видно и на рис. 1а, 1б в данной статье, о которых пойдет речь ниже. Поэтому мы будем отдельно анализировать данные для видов из порядков Asparagales и Liliales и других видов. T_C были значительно выше у представителей порядка Liliales (48.2 ± 12.5 ч (от 1.8 до 120 ч)), чем у остальных видов (13.4 ± 0.57 ч (от 6 до 27.4 ч)). Продол-

Таблица 1. Продолжительность митотического цикла (T_C) и отдельных его периодов (T_M , T_{G1} , T_S , T_{G2}), число хромосом (N_{chr}), количество ДНК на одну хромосому ($2C_{val}/N_{chr}$) и плоидность (n) у разных видов (64 вида) (по Grif V.G. et al. (2002) и Kuroki, Tanaka (1973) (*Rumex acetosa* L.))

Вид	Семейство	Плоид- ность n	C_{val} , n	Число хромосом N_{chr}	$2C_{val}/N_{chr}$	T_C , ч	T_M/T_C	T_{G1} , ч	T_{G1}/T_C	T_S , ч	T_S/T_C	T_{G2} , ч	T_{G2}/T_C	$T_C - T_M$
<i>Allium cepa</i> L.	Amaryllidaceae	2	17.9	16	2.24	15.82	0.12	2.73	0.18	8.19	0.51	3.36	0.22	7.63
<i>Allium fistulosum</i> L.	Amaryllidaceae	2	11.8	16	1.48	18.8				10.3	0.55			8.5
<i>Allium sativum</i> L.	Amaryllidaceae	2	16.2	16	2.03	21.8	0.15	3.65	0.15	10.9	0.51	5.5	0.23	10.9
<i>Bellevia romana</i> (L.) Swet	Asparagaceae	2	8.5	12	1.42	21	0.13	6	0.29	7.0	0.33	5.3	0.25	14.0
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Fabaceae	2	1.14	40	0.06	8.6				2.8	0.33			5.8
<i>Lathyrus hirsutus</i> L.	Fabaceae	2	9.98	14	1.43	18.0		7.8	0.43	5.0	0.28			13.0
<i>Lathyrus angulatus</i> L.	Fabaceae	2	4.48	14	0.64	12.3		4.4	0.36	3.9	0.32			8.4
<i>Lathyrus articulatus</i> L.	Fabaceae	2	6.08	14	0.87	14.3		3.9	0.27	4.3	0.30			10.0
<i>Lathyrus latifolius</i> L.	Fabaceae	2	10.80	14	1.54	24.0				10.2	0.43			13.8
<i>Lathyrus odoratus</i> L.	Fabaceae	2	8.60	14	1.23	20.0				6.8	0.34			13.2
<i>Lathyrus tingitanus</i> L.	Fabaceae	2	9.05	14	1.29	16.8		6.3	0.38	5.3	0.32			11.5
<i>Pisum sativum</i> L.	Fabaceae	2	4.88	14	0.70	16.8	0.10	5.83	0.35	6.88	0.41	2.75	0.16	9.9
<i>Vicia faba</i> L.	Fabaceae	2	13.33	12	2.22	27.4	0.07	7.4	0.27	8.95	0.33	9	0.33	18.5
<i>Vicia faba</i> L. var. minor	Fabaceae	2	13.33	12	2.22	16.4		9	0.50	4.63	0.29	6	0.33	11.8
<i>Vicia sativa</i> L.	Fabaceae	2	2.25	12	0.38	13.2	0.08	2.3	0.17	4.62	0.34	5.23	0.43	8.6
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	2	2.05	22	0.19	13.0				6.6	0.51			6.4
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	2	1.00	18	0.11	8.0	0.08	1.3	0.16	2.7	0.34	2.9	0.36	5.3
<i>Crepis capillaris</i> L.	Asteraceae	2	2.10	6	0.70	11.4		4	0.33	3.3	0.29	3	0.25	8.1
<i>Haplopappus gracilis</i> (Nutt.) D.R.Morgan & R.L.Hartm.	Asteraceae	2	2.05	4	1.03	11.8	0.13	1.9	0.17	5.25	0.44	2.6	0.21	6.6
<i>Helianthus annuus</i> L.	Asteraceae	2	2.43	34	0.14	12.0	0.14	4.5	0.36	5.95	0.51	1.5	0.12	6.1
<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	2	2.43	18	0.29	10.0	0.15	1.7	0.17	4.9	0.49	1.9	0.19	5.1
<i>Impatiens balsamina</i> L.	Balsaminaceae	2	2.65	18	0.29	10.0	0.15			6.9	0.69			3.1
<i>Arabisidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Brassicaceae	2	0.17	10	0.03	8.5		1.7	0.20	2.8	0.33	4	0.47	5.7
<i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke	Caryophyllaceae	2	2.88	24	0.24	15.5		3.62	0.18	10.7	0.56	2.56	0.14	9.8
<i>Tradescantia paludosa</i> L.	Commelinaceae	2	18.05	12	3.44	19.1	0.13	6	0.27	4	0.18	9	0.41	18.0
<i>Luzula purpurea</i> Lowe	Juncaceae	2	4.30	6	1.43	22.0	0.10	3	0.10	15.2	0.51	9	0.30	14.8
<i>Tulipa kaufmanniana</i> L.	Liliaceae	2	22.6	24	1.88	30.0				5	0.50			5.0
<i>Papaver nudicaule</i> L.	Papaveraceae	2	1.75	14	0.25	10.0		1.7	0.15	6.2	0.54	3	0.26	5.2
<i>Papaver somniferum</i> L.	Papaveraceae	2	3.80	22	0.35	12.0				4.2	0.39	3	0.28	6.5
<i>Aegilops squarrosa</i> auct. (tauschii Coss.)	Poaceae	2	5.10	14	0.73	11.4	0.05			4.3	0.48	2.9	0.33	4.6
<i>Aegilops umbellulata</i> Zhuk.	Poaceae	2	5.05	14	0.72	10.7	0.04	2.5	0.23					
<i>Avena pilosa</i> (Roem. & Schult.) Bieb.	Poaceae	2	4.74	14	0.68	8.9	0.19	0	0.00					
<i>Avena strigosa</i> Schreb	Poaceae	2	4.00	14	0.57	9.8	0.18	2.5	0.26	3.6	0.37	2	0.20	6.2
<i>Festuca rubra</i> L.	Poaceae	2	4.73	42	0.23	16.2	0.15	3.5	0.22	6.6	0.41	3.4	0.21	9.6

Таблица 1. Окончание

Вид	Семейство	Плод- нось n	$C_{вал, ПП}$	Число хромосом	$2C_{вал}/Nchr$	$T_{C, Ч}$	$T_{M, Ч}$	T_M/T_C	$T_{G1, Ч}$	T_{G1}/T_C	$T_{S, Ч}$	T_S/T_C	$T_{G2, Ч}$	T_{G2}/T_C	T_{C-M}
<i>Haynaldia vilosa</i> (L.) Schur black seeds	Poaceae	2	5.35	14	0.76	9.5	1.5	0.16	2.7	0.28	2.9	0.31	2.4	0.25	6.6
<i>Haynaldia vilosa</i> (L.) Schur brown seeds	Poaceae	2	5.35	14	0.76	12.8	1.3	0.10	1.8	0.14	4.9	0.38	4	0.31	7.9
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Poaceae	2	5.50	14	0.79	12.5	0.93	0.07	1.9	0.15	4.8	0.38	4.56	0.37	7.7
<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae	2	2.09	14	0.30	8.1	0.45	0.04	0.5	0.06	4.2	0.52	5	0.40	3.9
<i>Pennisetum americanum</i> (L.) Leeke	Poaceae	2	2.40	14	0.34	12.4	0.45	0.04	2	0.16	4.5	0.36	5	0.40	7.9
<i>Phalaris canariensis</i> L.	Poaceae	2	3.83	12	0.64	14.5	1.6	0.11	2.7	0.19	3.4	0.23	6.8	0.47	11.1
<i>Secale cereale</i> L.	Poaceae	2	8.28	14	1.18	14.6	1.5	0.11	1.6	0.13	6.77	0.48	3.33	0.26	7.8
<i>Triticum monocoecum</i> L.	Poaceae	2	2.73	14	0.89	11.6	0.8	0.07	2.8	0.24	5.25	0.45	3	0.27	6.4
<i>Phalaris canaminor</i> Retz.	Poaceae	2	4.50	28	0.32	18.0	1.8	0.10	3.8	0.21	6.4	0.36	6	0.33	11.6
<i>Zea mays</i> l	Poaceae	2	2.73	20	0.27	10.5	1.67	0.16	1.05	0.10	4.25	0.41	3.82	0.36	6.3
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.	Polygonaceae	2	1.44	16	0.18	6.0	1.8	0.11	1	0.17	2.5	0.42	2.5	0.42	3.5
<i>Rumex thyrsiflorus</i> Fingerh	Polygonaceae	2	3.90	14	0.56	16.0	1.8	0.11	2.4	0.15	8	0.50	3.5	0.22	8.0
<i>Rumex acetosa</i> L.	Polygonaceae	2	7.1	16	1.76	15.5	1.8	0.11	1.5	0.09	2.8	0.18	3.5	0.22	12.7
<i>Nigella damascena</i> L.	Ranunculaceae	2	10.55	12	0.42	16.5	1.8	0.11	1.5	0.09	10.5	0.64	3.4	0.31	6.0
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> Viv.	Solanaceae	2	4.15	20	0.42	11.0	1.8	0.11	1.5	0.09	5.7	0.52	3.4	0.31	5.3
<i>Solanum lycopersicum</i> L. ssp. Cultum	Solanaceae	2	2.55	12	0.43	12.6	1.8	0.11	1.5	0.09	5.8	0.46	3	0.24	6.8
<i>Antirrhinum majis</i> L.	Scrophulariaceae	2	0.65	16	0.08	10.0	1.8	0.11	4	0.40	4.5	0.45	3	0.24	5.5
<i>Paris quadrifolia</i> L.	Trilliaceae	2	50.5	10	10.10	56.0	6.5	0.12	6.5	0.12	32	0.57	11	0.20	24
<i>Trillium canadensis</i> Kerl-Gawl	Trilliaceae	2	71.0	10	10.41	71.0	8.2	0.12	4.2	0.06	40.5	0.57	18	0.25	30.5
<i>Trillium grandiflorum</i> Salish	Trilliaceae	2	52.03	10	10.41	120.0	8.2	0.12	4.2	0.06	30	0.25	18	0.25	90
<i>Allium porrum</i> L.	Amaryllidaceae	4	29.3	32	1.83	18.0	0.2	0.02	1.05	0.06	7.9	0.43	8.5	0.50	10.1
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	Brassicaceae	4	1.53	36	0.09	12.0	0.2	0.02	2.7	0.23	5.5	0.46	3.5	0.29	6.5
<i>Triticum dicoccoides</i> (Koern.) Aar- onsohn	Poaceae	4	12.28	28	0.88	15.5	0.77	0.05	2.7	0.17	7.6	0.49	4.4	0.28	7.9
<i>Triticum timopheevi</i> (Zhuk.) Zhuk.	Poaceae	4	11.30	28	0.81	15.0	0.83	0.06	1.3	0.09	7.5	0.50	5.4	0.36	7.5
<i>Triticum turgidum</i> (durum) Desf.	Poaceae	4	12.66	28	0.90	12.3	0.75	0.06	3.3	0.27	5.5	0.45	4.3	0.35	6.8
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Solanaceae	4	5.85	28	0.42	12.5	1.7	0.14	3.3	0.27	5.0	0.40	2.0	0.16	7.5
<i>Papaver orientale</i> L.	Papaveraceae	6	8.93	42	0.43	16.0	2.4	0.22	3.3	0.30	9	0.56	0.5	0.05	7.0
<i>Avena sativa</i> L.	Poaceae	6	13.23	42	0.63	11.0	2.4	0.22	3.3	0.30	4.8	0.44	0.5	0.05	6.2
<i>Triticum aestivum</i> L.	Poaceae	6	17.30	42	0.82	13.3	2	0.15	1.63	0.12	6.5	0.49	3.8	0.28	6.8
<i>Trillium rhombiflorum</i> Kom	Trilliaceae	6	111.5	30	7.43	110.0	2	0.15	25	0.23	53.3	0.48	22	0.20	56.7

Таблица 2. Средняя величина, ошибка, минимальное и максимальное значение продолжительности митотического цикла (T_C), его отдельных периодов (T_M , T_{G1} , T_S , T_{G2}), частей периодов (T_M/T_C , T_{G1}/T_C , T_S/T_C , T_{G2}/T_C), числа хромосом (N_{chr}), среднее количество ДНК на одну хромосому ($2C_{val}/N_{chr}$), среднее голоплоидное содержание ДНК (C_{val}) для числа видов (N)

Виды, кроме Asparagales и Liliales						Виды из порядка Asparagales и Liliales					
	N	среднее	ошибка	max	min		N	среднее	ошибка	max	min
T_C , ч	53	13.44	0.57	27.40	6.00	T_C , ч	10	48.24	12.54	120.0	15.82
T_M , ч	31	1.44	0.12	3.00	0.20	T_M , ч	6	4.26	1.03	8.2	1.63
T_M/T_C	31	0.11	0.01	0.22	0.02	T_M/T_C	6	0.12	0.01	0.15	0.10
T_{G1} , ч	40	3.10	0.32	9.00	0.00	T_{G1} , ч	8	6.52	2.71	25.0	1.05
T_{G1}/T_C	40	0.22	0.02	0.50	0.00	T_{G1}/T_C	8	0.15	0.03	0.29	0.06
T_S , ч	53	5.54	0.27	10.70	2.50	T_S , ч	10	21.53	5.17	53.3	7.00
T_S/T_C	53	0.42	0.01	0.69	0.18	T_S/T_C	10	0.47	0.03	0.57	0.25
T_{G2} , ч	36	3.79	0.31	9.00	0.50	T_{G2} , ч	8	10.33	2.31	22.00	3.36
T_{G2}/T_C	36	0.29	0.02	0.47	0.05	T_{G2}/T_C	8	0.27	0.04	0.50	0.20
N_{chr}	53	18.91	1.35	42.00	4.00	N_{chr}	9	18.44	2.76	32.00	10.00
$2C_{val}/N_{chr}$	53	0.36	0.04	1.72	0.02	$2C_{val}/N_{chr}$	9	2.16	0.64	5.20	0.71
$T_C - T_S$, ч	53	7.90	0.44	18.45	3.10	$T_C - T_S$, ч	0	26.71	8.47	90.00	7.63
$(T_C - T_S)/T_C$	53	0.58	0.01	0.82	0.31	$(T_C - T_S)/T_C$	0	0.53	0.03	0.75	0.43
C_{val} , пг	53	5.70	0.60	18.05	0.17	C_{val} , пг	9	35.59	10.84	111.50	8.50

жительности митоза T_M были также значительно выше у видов этих порядков, чем остальных растений (табл. 2). Однако, соотношения (T_M/T_C) продолжительностей митоза и всего цикла были одинаковыми у тех и других (0.12 ± 0.01 и 0.11 ± 0.01), хотя отношения T_M/T_C варьировали значительно меньше, чем у видов из порядков Asparagales и Liliales (табл. 2). Эти результаты показывают, что по различиям в величинах митотического индекса (отношения между T_C и T_M) нельзя судить о том, как отличаются T_C у сравниваемых объектов.

Самым длительным был T_S период, который составлял у видов порядков Asparagales и Liliales 0.47 ± 0.3 и 0.42 ± 0.01 ч у остальных видов. У Asparagales и Liliales также более длительными были и периоды T_{G1} и T_{G2} , которые составляли примерно половину длительности всего цикла (табл. 2).

Корреляции между продолжительностями отдельных периодов цикла и всего цикла. Корреляции между продолжительностями отдельных периодов цикла представлены в табл. 3. Среди изученных видов порядков Asparagales и Liliales есть данные только для одного тетраплоида и одного гексоплоида. Поэтому для них не анализировались отдельно диплоиды и тетраплоиды.

Наибольшее количество изученных видов относятся к диплоидам. У них четкие корреляции

между T_C и T_M и продолжительностями отдельных периодов T_{G1} , T_S , T_{G2} . Однако, доли продолжительностей отдельных периодов митотического цикла не коррелируют с ним. Аналогичные результаты получаются и для тетраплоидов, не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales, и для видов из этих порядков. Однако, в этих группах есть данные для небольшого числа видов и поэтому данные о корреляциях между T_{G1} , T_{G2} и T_C для тетраплоидов не достоверны.

Из приведенных в табл. 2 данных следует, что нельзя делать выводы о различиях T_C у сравниваемых видов, определяя доли процента делящихся клеток или клеток на других стадиях цикла.

Кроме того, при увеличении T_S периода с возрастом C_{val} , удлиняется и продолжительность других фаз. Следовательно, удлинение цикла не происходит только за счет увеличения длительности T_S периода.

Корреляции между продолжительностями отдельных периодов цикла. У диплоидов, не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales, заметная корреляция между T_{G1} и T_{G2} и отрезком цикла без продолжительности T_S периода.

Нет достоверных корреляций между числом хромосом и продолжительностью митоза и отдельных периодов цикла.

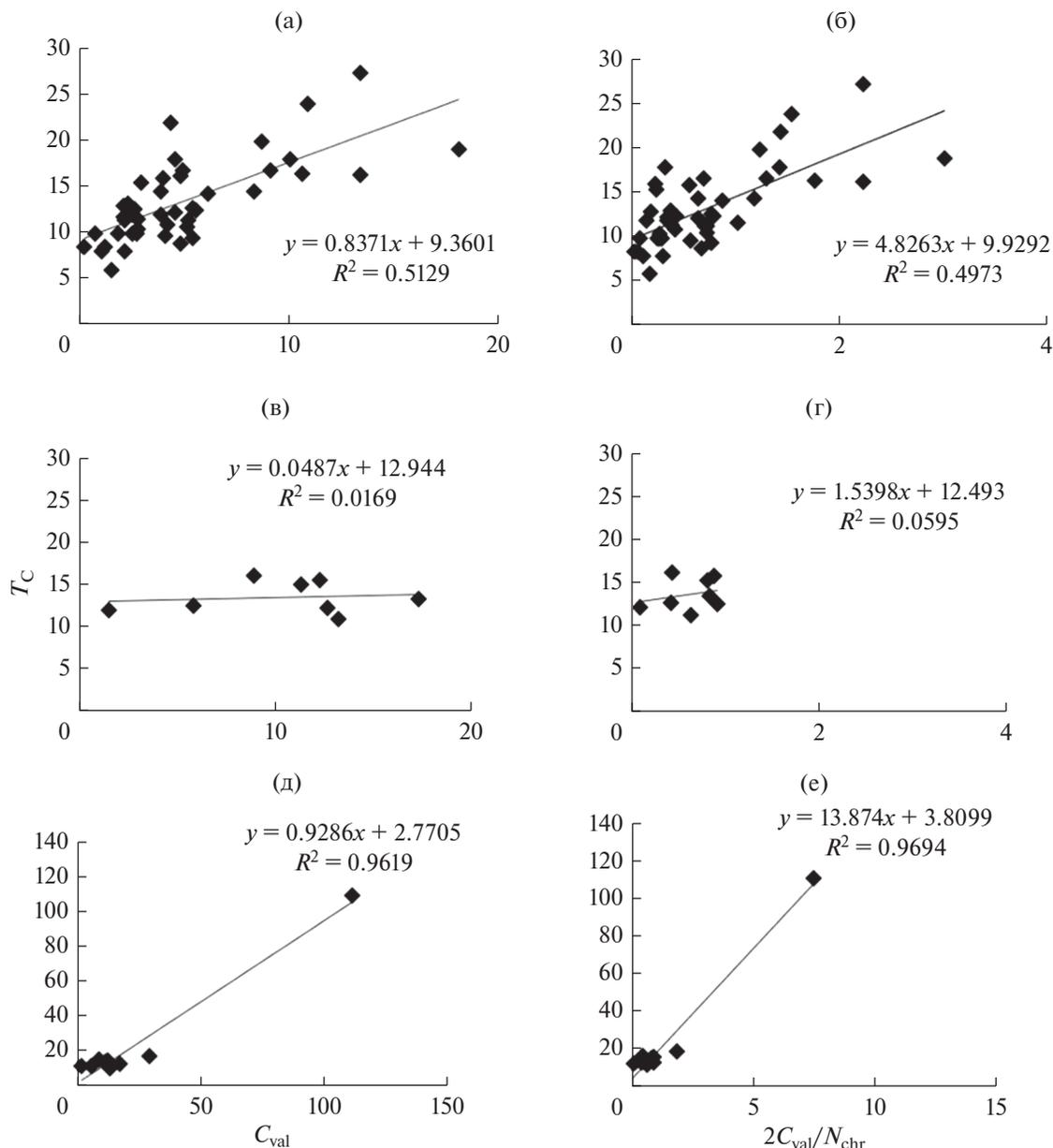


Рис. 1. Зависимость продолжительности митотического цикла (T_C) от голоплоидного содержания ДНК (C_{val}) и отношения количества ДНК на число хромосом ($2C_{val}/N_{chr}$) у диплоидов, не относящимся к порядкам Asparagales и Liliales (а, б); у полиплоидов не относящимся к порядкам Asparagales и Liliales (в, г) и у всех полиплоидов (д, е).

Зависимость продолжительности митотического цикла от голоплоидного содержания ДНК и среднего содержания ДНК в хромосоме. На рис. 1. показаны кривые зависимости T_C от C_{val} и среднего содержания ДНК в хромосоме ($2C_{val}/N_{chr}$). Величина T_C с увеличением C_{val} наиболее резко возрастает у Asparagales и Liliales (рис. 1в), и заметно слабее у диплоидов, не относящихся к этим порядкам (рис. 1а). У полиплоидов, не относящихся к Asparagales и Liliales T_C практически не меняется с увеличением C_{val} .

Таким образом, четкий нуклеотипический эффект (увеличение T_C с возрастанием C_{val}) наблюдается у видов, относящихся к порядкам Asparagales и Liliales, и диплоидов, не относящихся к этим порядкам. Для полиплоидов пока нет достаточно данных, чтобы сделать обоснованный вывод о зависимости T_C от C_{val} .

Полученные нами результаты противоречит выводу, сделанному Francis et al. (2008) в статье "A strong nucleotypic effect on cell cycle regardless ploidy level". Как видно на рис. 2, построенным по данным этой статьи, у полиплоидов есть только

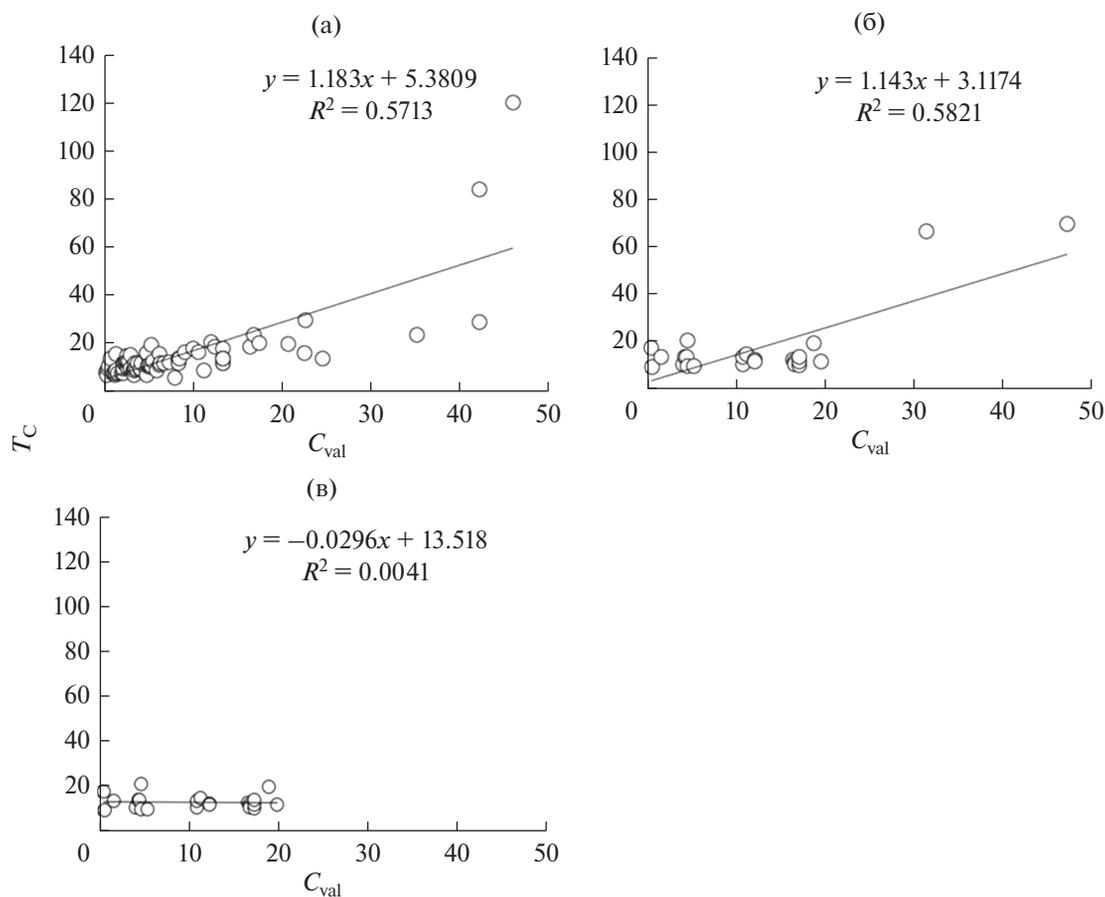


Рис. 2. Зависимость продолжительности митотического цикла (T_C) от голоплоидного содержания ДНК (C_{val}) согласно данным Francis et al. (2008) у диплоидов (а); полиплоидов (б) и полиплоидов не относящимся к порядкам Asparagales и Liliales (в).

две точки для триплоида и тетраплоида *Scilla sibirica*, относящихся к порядку Asparagales, из-за которых при линейном сглаживании получается заметное удлинение цикла и увеличением C_{val} у остальных видов. На самом деле четко видно, что эти результаты нельзя описывать линейной зависимостью, так как виды, относящиеся к порядкам Asparagales и Liliales, резко отличаются от других изученных растений и зависимость между T_C и C_{val} явно нелинейная. Зависимость T_C от C_{val} для растений, не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales, проанализированных в статье Francis et al., (2008), такая же, как у видов, описываемых в этой статье.

Корреляции между голоплоидным содержанием ДНК и продолжительностью отдельных периодов митотического цикла. В табл. 3 и на рис. 3 показано, как зависит продолжительность отдельных периодов цикла от C_{val} у диплоидов, не относящихся к Asparagales и Liliales, для которых имеется наибольшее количество данных. У них наибольший коэффициент корреляции между C_{val} и продолжи-

тельностью T_S периода. Однако, коэффициент корреляции между T_{G1} и C_{val} только незначительно ниже. Между продолжительностью периода T_{G2} и C_{val} он недостоверен. По данным (Evans et al., 1972), полученным на небольшом числе видов, нет корреляции между T_{G1} и T . У полиплоидов, не относящихся к Asparagales и Liliales, нет достоверной корреляции между продолжительностями отдельных периодов и C_{val} . Также у Asparagales и Liliales высокий коэффициент корреляции между T_S и C_{val} и существенно более низкие между T_{G1} и T_{G2} . Заметная корреляция между T_M и C_{val} была только у полиплоидов и Asparagales и Liliales и заметно меньшая у диплоидов, не относящихся к ним.

Таким образом, хотя пока имеется относительно немного данных, тем не менее ясно, что с увеличением C_{val} удлиняется продолжительность T_S периода. Однако, это не является единственной причиной удлинения T_C , так как продолжительность других периодов, особенно T_{G1} , также увеличивается.

Таблица 3. Корреляции между продолжительностью митотического цикла (T_C), его отдельными периодами (T_M , T_{G1} , T_S , T_{G2}), частями периодов (T_M/T_C , T_{G1}/T_C , T_S/T_C , T_{G2}/T_C), голополидным содержанием ДНК (C_{val}), числом хромосом (N_{chr}) и голополидным содержанием ДНК на хромосому ($2C_{val}/N_{chr}$) у диплоидов ($N = 46$) (95% ≥ 0.30 ; 99% ≥ 0.38), полиплоидов ($N = 8$) (95% ≥ 0.71 ; 99% ≥ 0.83) не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales и у видов из порядков Asparagales и Liliales ($N = 10$) (95% ≥ 0.67 ; 99% ≥ 0.80)

Диплоиды	C_{val}	T_C	T_M	T_M/T_C	T_{G1}	T_{G1}/T_C	T_S	T_S/T_C	T_{G2}	T_{G2}/T_C	N_{chr}	$2C_{val}/N_{chr}$	$T_C - T_S$
C_{val}	1.00												
T_C	0.72	1.00											
T_M	0.40	0.59	1.00										
T_M/T_C	-0.04	0.17	0.66	1.00									
T_{G1}	0.52	0.71	0.54	-0.11	1.00								
T_{G1}/T_C	0.21	0.32	0.27	-0.07	0.87	1.00							
T_S	0.64	0.67	0.38	-0.07	0.20	-0.09	1.00						
T_S/T_C	-0.01	0.24	0.12	0.16	0.49	-0.48	0.53	1.00					
T_{G2}	0.28	0.72	0.28	-0.28	0.52	0.15	0.10	-0.66	1.00				
T_{G2}/T_C	-0.26	0.07	0.25	-0.34	0.16	-0.27	0.52	-0.59	0.60	1.00			
N_{chr}	-0.21	0.12	0.20	0.21	0.02	0.02	0.01	0.14	-0.22	-0.27	1.00		
$2C_{val}/N_{chr}$	0.93	0.68	0.40	-0.05	0.49	0.19	0.57	-0.06	0.32	-0.22	-0.42	1.00	
$T_C - T_S$	0.55	0.90	0.53	-0.17	0.78	0.45	0.29	-0.61	0.88	0.18	-0.17	0.55	1.00
Полиплоиды	C_{val}	T_C	T_M	T_M/T_C	T_{G1}	T_{G1}/T_C	T_S	T_S/T_C	T_{G2}	T_{G2}/T_C	N_{chr}	$2C_{val}/N_{chr}$	$T_C - T_S$
C_{val}	1.00												
T_C	0.13	1.00											
T_M	0.53	0.37	1.00										
T_M/T_C	0.46	0.49	0.99	1.00									
T_{G1}	-0.20	0.60	0.02	0.14	1.00								
T_{G1}/T_C	-0.21	0.79	0.15	0.29	0.96	1.00							
T_S	0.16	0.96	0.37	-0.48	0.69	-0.85	1.00						
T_S/T_C	0.20	0.82	0.32	-0.40	0.87	-0.97	0.94	1.00					
T_{G2}	0.11	0.76	0.70	-0.78	0.58	-0.72	0.80	0.74	1.00				
T_{G2}/T_C	0.01	0.59	0.76	-0.83	0.47	-0.58	0.64	0.63	0.97	1.00			
N_{chr}	0.19	0.14	0.58	0.61	0.04	0.22	0.10	0.36	-0.52	-0.49	1.00		
$2C_{val}/N_{chr}$	0.88	0.24	0.20	0.13	0.17	-0.27	0.17	0.10	0.39	0.28	-0.29	1.00	
$T_C - T_S$	0.01	0.70	0.29	-0.39	0.43	-0.64	0.47	0.16	0.53	0.38	-0.69	0.33	1.00

Таблица 3. Окончание

Виды из порядков Asparagales и Liliales	C_{val}	T_C	T_M	T_M/T_C	T_{G1}	T_{G1}/T_C	T_S	T_S/T_C	T_{G2}	T_{G2}/T_C	N_{chr}	$2C_{val}/N_{chr}$	$T_C - T_S$
C_{val}	1.00												
T_C	0.83	1.00											
T_M	0.88	0.98	1.00										
T_M/T_C	-0.36	-0.36	-0.18	1.00									
T_{G1}	0.92	0.85	0.41	0.09	1.00								
T_{G1}/T_C	0.14	0.07	-0.66	0.41	0.49	1.00							
T_S	0.97	0.87	0.97	-0.36	0.76	-0.04	1.00						
T_S/T_C	-0.03	-0.32	0.59	-0.26	-0.02	-0.61	0.13	1.00					
T_{G2}	0.97	0.96	0.94	-0.41	0.73	-0.13	0.96	0.35	1.00				
T_{G2}/T_C	-0.27	-0.41	-0.18	-0.44	-0.43	-0.49	0.43	-0.36	0.18	1.00			
N_{chr}	0.36	-0.03	-0.48	-0.42	0.32	-0.34	0.16	0.19	0.52	0.61	1.00		
$2C_{val}/N_{chr}$	0.70	0.86	0.91	-0.21	0.57	-0.02	0.79	-0.21	0.66	-0.47	0.29	1.00	
$T_C - T_S$	0.67	0.96	0.93	-0.34	0.98	0.34	0.71	-0.61	0.96	-0.38	0.13	0.80	1.00

Таблица 4. Зависимость продолжительности митотического цикла (T_C) и его периодов (T_M , T_{G1} , T_S , T_{G2}) от голоплоидного содержания ДНК (C_{val}), описанная линейным уравнением $T = aC_{val} + b$, где a , b – коэффициенты, R^2 – коэффициент детерминации

Периоды	Виды из порядков Asparagales и Liliales			Виды не из порядков Asparagales и Liliales					
				диплоиды			тетраплоиды		
	a	b	R^2	a	b	R^2	a	b	R^2
T_C	1.016	3.253	0.54	0.837	9.36	0.51	0.05	12.9	0.02
T_M	0.115	0.18	0.64	0.07	1.57	0.16	0.08	0.38	0.28
T_{G1}	0.21	-1.15	0.81	0.28	1.78	0.27	-0.03	2.85	0.04
T_S	0.48	0.89	0.81	0.34	3.75	0.64	0.05	5.43	0.02
T_{G2}	0.19	1.25	0.87	0.14	3.23	0.08	0.03	3.04	0.02
$T_C - T_S$	0.18	-0.27	0.58	0.14	3.23	0.08	0.03	3.04	0.02

Francis et al. (2008) предложили гипотезу, объясняющую причины удлинений T_C увеличением C_{val} . Однако, это не объясняет причины удлинения других периодов митотического цикла, так как одного удлинения T_S периода недостаточно для объяснения зависимости T_C от C_{val} .

До сих пор неясно, как объяснить отсутствие зависимости T_C от C_{val} у полиплоидов, не относящихся к порядкам Asparagales и Liliales. Дальнейшее изучение этого вопроса представляет большой интерес для выяснения механизмов регуляции продолжительности митотического цикла.

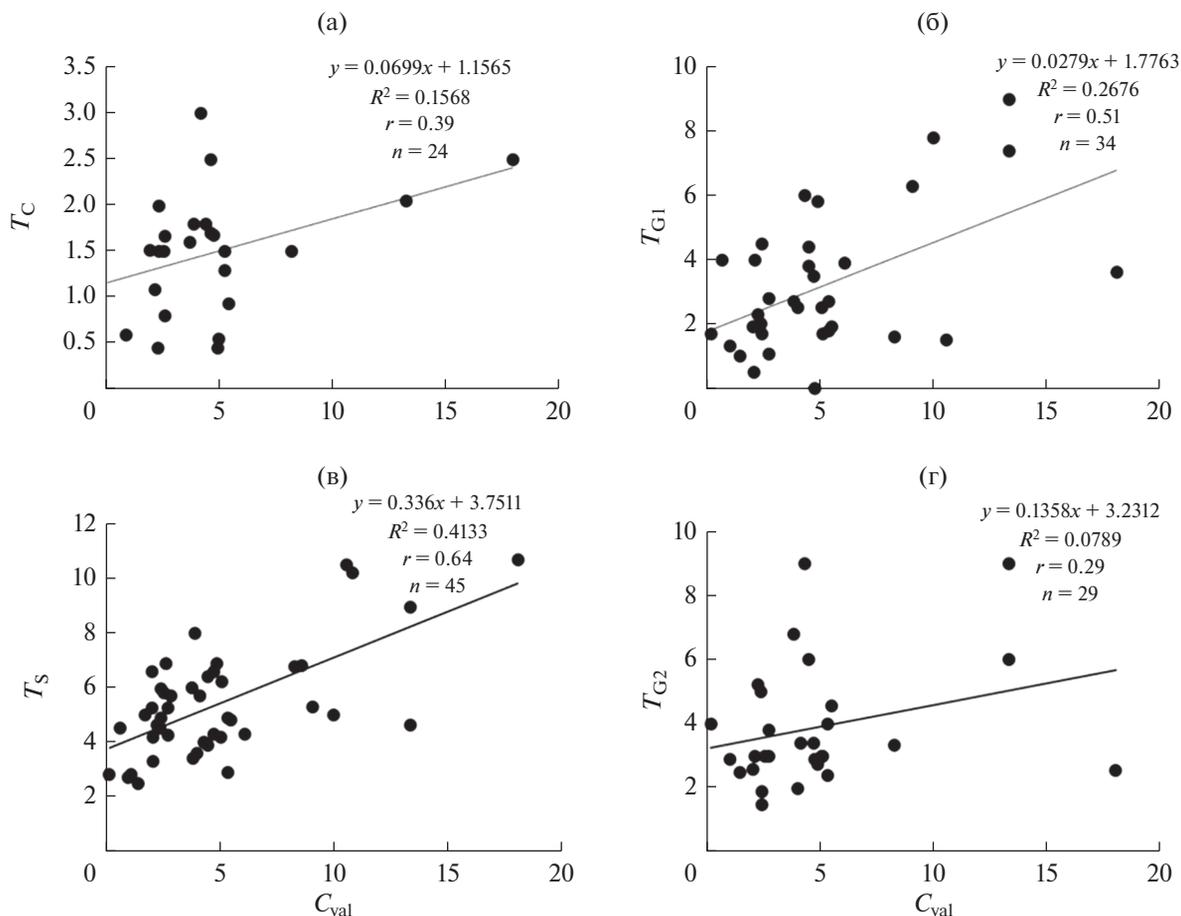


Рис. 3. Зависимость периодов (T_M (а), T_{G1} (б), T_S (в), T_{G2} (г) митотического цикла (T_C) от голоплоидного содержания ДНК (C_{val}) у диплоидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы очень благодарны рецензентам за важные замечания и А.В. Носову за указание работ, которые нами были не использованы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа частично поддержана Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (номер темы 122042700044-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Жуковская Н.В. и Иванов В.Б. внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванов В.Б. Содержание ДНК в ядре и скорость развития растений // Онтогенез. 1978. Т. 9. С. 39–53.
- Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с.
- Лунькова Н.Ф., Жуковская Н.В., Иванов В.Б. Взаимосвязь голоплоидного содержания ДНК с жизненной формой и продолжительностью жизненного цикла растений // Онтогенез. 2020. Т. 51. С. 450–459.
- Шереметьев С.Н., Чеботарева К.Е. Современная и мел-кайнозойская диверсификация покрытосеменных // Журн. общей биологии. 2018. Т. 79. № 1. С. 28–54.
- Шереметьев С.Н., Гамалей Ю.В., Слемнев Н.Н. Направления эволюции генома покрытосеменных // Цитология. 2011. Т. 53. № 4. С. 295–312.

- Bennett M. Nuclear DNA content and minimum generation time // Proc. R. Soc. London, Ser. B. 1972. V. 181. P. 109.
- Davies P., Rees H. Mitotic cycle in Triticum species // Heredity. 1975. V. 35. P. 337–345.
- Evans G.M., Rees H. Mitotic cycles in Dicotyledons and Monocotyledons // Nature. 1971. V. 233. P. 350–351.
- Evans G.M., Rees H., Snell C.L., Sun S. The relationship between nuclear DNA amount and time duration of the mitotic cycle // Chromosome Today. 1972. V. 3. P. 24–31.
- Francis D., Davies M.S., Barlow P.W. A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level // Annals Bot. 2008. V. 101. P. 747–757.
- Greilhuber J., Leitch I.J. Genome Size and the Phenotype. 2013. V. 2. P. 323–344.
- Grif V.G., Ivanov V.B., Machs E.M. Cell cycle and its parameters in flowering plants // Cytologia. 2002. V. 44. P. 936–980.
- Ivanov V.B. Ambiguous dependence of minimal plant generation time on nuclear DNA content // Nat. Preced. 2010. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.4943.1>
- Kidd A.D., Francis D., Bennett M.D. Replicon size, mean rate of DNA replication and the duration of the cell cycle and its component phases in eight monocotyledonous species of contrasting DNA C-values // Annals Bot. 1987. V. 59. P. 603–609.
- Kuroki Y., Tanaka R. Duration of mitotic cell cycle in root tip cells of male *Rumex acetosa* // Jpn. J. Genet. 1973. V. 48. P. 19–26.
- Leitch I.J., Johnston E., Pellicer J. et al. Plant DNA C-values Database (Release 7.1). 2019. <https://cvalues.science.kew.org/>.
- Mickelson-Young L., Wear E., Mulvaney P. et al. A flow cytometric method for estimating S-phase duration in plants // J. Experimental Botany. 2016. V. 67. P. 6077–6087.
- Nagl W. Mitotic cycle time in perennial and annual plants with various amount of DNA and heterochromatin // Developmental Biology. 1974. V. 39. P. 342–346.
- Nagl W. Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1978.
- Olszewska M.J., Bilecka A., Kuran H. et al. The lack of correlation between the rate of rRNA transport from nucleoli into cytoplasm and the duration of G1 and G2 phases in root meristem cells // Folia Histochemica et Cytobiologica. 1989. V. 27. P. 107–119.
- Šimová I., Herben T. Geometrical constraints in the scaling relationships between genome size, cell size and cell cycle length in herbaceous plants // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2012. V. 279. P. 867–875.
- Van't Hof J. Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. Experimental Cell Research. 1965. V. 39. P. 48–58.
- Van't Hof J., Sparrow A.H. A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1963. V. 49. P. 897–902.
- Zhukovskaya N.V., Bystrova E.I., Dubrovsky J.G., Ivanov V.B. Global analysis of an exponential model of cell proliferation for estimation of cell cycle duration in the root apical meristem of angiosperms // Annals Bot. 2018. V. 122. P. 811–822.

Dependence of the Duration of Single Periods of the Mitotic Cycle on the Holoploid DNA Content in the Root Apical Meristems

N. V. Zhukovskaya^{1,*} and V. B. Ivanov^{1,**}

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya, 35, Moscow, 127276 Russia

*e-mail: nataliazhukovskaya@mail.ru

**e-mail: ivanov_vb@mail.ru

The dependence of the duration of individual periods of the mitotic cycle on the holoploid DNA content, the number of chromosomes, and the average amount of DNA per chromosome for 64 species was analyzed. In diploids, the durations of the mitotic cycle and durations of the T_S and T_{G1} periods increased with an increase in the holoploid DNA content, and a slight increase in the duration of mitosis (T_M) and T_{G2} period was insignificant. The duration of the sum of T_{G1} , T_{G2} and T_M durations increased with an increase in the holoploid DNA content, but not as sharply as the duration of the whole cycle. In representatives of the orders Asparalales and Liliales, which differ from other species in holoploid DNA content, which is significantly higher, and in the duration of mitotic cycles, these correlations were more pronounced and in them this was observed for the duration of mitosis and the T_{G2} period. In polyploid species not belonging to the orders Asparalales and Liliales, only the duration of mitosis T_M weakly depended on the holoploid DNA content, while no dependence was observed on the duration of the whole cycle and its periods. No data are available for the polyploid species from Asparalales and Liliales.

Keywords: mitotic cycle, periods, holoploid DNA content, root