

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 51, номер 4, 2020

---

---

## ОБЗОРЫ

- Drosophila melanogaster* как модель генетики развития:  
современные подходы и перспективы  
*Л. Н. Нефедова* 243
- Репрограммирование дифференцированного ретинального  
пигментного эпителия млекопитающих и человека:  
современные достижения и перспективы  
*Л. А. Ржанова, А. В. Кузнецова, М. А. Александрова* 254
- Церебральные органоиды: модель развития мозга  
*К. К. Сухинич, М. А. Александрова* 275
- 

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

- Гетерохрония экспрессии генов *Lanf* и *FoxG1* у миноги подтверждает появление  
конечного мозга как эволюционно молодой надстройки  
в центральной нервной системе позвоночных  
*Г. В. Ермакова, А. В. Кучерявый, А. Г. Зарайский, А. В. Байрамов* 292
- Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода  
в индивидуальном развитии *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda)  
*А. А. Зотин* 302
- 

## ТОЧКА ЗРЕНИЯ

- Нарушения межклеточных взаимодействий при старении  
могут быть исправлены  
*В. Я. Бродский* 309
- Терапия мезенхимальными стволовыми клетками – сосуд наполовину полон  
или наполовину пуст?  
*Ю. В. Суханов, Е. А. Воротеляк, И. В. Лядова, А. В. Васильев* 316
- 
-

# Contents

---

---

Vol. 51, No. 4, 2020

---

---

## REVIEWS

- Drosophila melanogaster* as a Model of Development Genetics:  
Modern Approaches and Prospects  
*L. N. Nefedova* 243
- Reprogramming of Differentiated Mammalian and Human Retinal Pigment Epithelium:  
Current Achievements and Prospects  
*L. A. Rzhanova, A. V. Kuznetsova, and M. A. Aleksandrova* 254
- Cerebral Organoids: Brain Development Model  
*K. K. Sukhinich and M. A. Aleksandrova* 275
- 

## BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

- Heterochrony of the Expression of *Lanf* and *Foxg1* in Lamprey Confirms the Appearance  
of the Telencephalon as an Evolutionarily Young Superstructure  
in the Central Nervous System of Vertebrates  
*G. V. Ermakova, A. V. Kucheryavyy, A. G. Zarskiy, and A. V. Bayramov* 292
- Endogenous Biorhythms of Mass Specific Rate of Oxygen Consumption  
in Individual Development of *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda)  
*A. A. Zotin* 302
- 

## POINT OF VIEW

- Cell-Cell Interaction Disorders Associated with the Senescence Can Be Repaired  
*V. Ya. Brodsky* 309
- News and Views Mesenchymal Stem Cells Therapy – Is a Glass Half Full or Half Empty?  
*Yu. V. Sukhanov, E. A. Vorotelyak, I. V. Lyadova, and A. V. Vasiliev* 316
- 
-

УДК 575.16

## ***DROSOPHILA MELANOGASTER* КАК МОДЕЛЬ ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

© 2020 г. Л. Н. Нефедова\*

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,  
Москва, 119234 Россия

\*e-mail: lidia\_nefedova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2020 г.

После доработки 26.02.2020 г.

Принята к публикации 29.02.2020 г.

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* уже более ста лет успешно служит универсальной моделью в различных генетических исследованиях, в том числе в исследованиях генетического контроля индивидуального развития. К настоящему времени для дрозофилы разработан целый арсенал методов обратной генетики, позволяющих довольно легко манипулировать с ее геномом, что позволяет считать дрозофилу одной из самых мощных моделей генетики развития. В обзоре рассмотрены основные современные методы исследования экспрессии и функции генов у дрозофилы и перспективы их применения.

*Ключевые слова:* дрозофила, генетика развития, модель, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S0475145020040059

### ВВЕДЕНИЕ

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* уже более ста лет успешно служит универсальной моделью в различных генетических исследованиях. За это время на дрозофиле был сделан целый ряд знаменательных открытий, касающихся структуры гена, генетического сцепления, механизмов мутагенеза и рекомбинации, генетической нестабильности и микроэволюционных процессов в популяциях. Дрозофила как модель помогла сделать важнейшие фундаментальные открытия и в области биологии развития: с ее помощью были расшифрованы базовые консервативные генетические механизмы, регулирующие отдельные этапы индивидуального развития.

Для поиска генов, контролирующих развитие, долгое время применяли классический подход: индукция мутаций с помощью химического или радиационного мутагенеза и анализ мутантного фенотипа методами гибридологического анализа, с последующим тщательным генетическим картированием генов (Riggleman et al., 1989). Около 20 лет назад геном *D. melanogaster* был полностью секвенирован и аннотирован. Это сделало возможным применение стратегии обратной генетики в генетическом анализе развития дрозофилы. Одним из основных подходов исследования функции гена методами обратной генетики является его направленная инактивация с последующим изучением мутантного фенотипа. В

2000-е годы была предложена система инактивации генов у дрозофилы, основанная на гомологичной рекомбинации (Rong et al., 2000). Затем были усовершенствованы методы выключения генов с использованием систем транспозонного мутагенеза (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015), внедрена методика выключения и редактирования генов CRISPR-Cas (Ewen-Campen et al., 2017). Полное выключение генов, контролирующих онтогенез, часто сопровождается летальным фенотипом, что затрудняет исследование функций таких генов. Проблему позволяют преодолевать системы для инактивации генов, которую можно осуществлять направленно в специфических тканях или даже в определенных индивидуальных клетках (Theodosiou et al., 1998; Lee, Luo, 2001; Ryder, Russell, 2003). Разработаны также системы для исследования ткане- и возрастоспецифичной экспрессии отдельных генов (McGuire et al., 2004).

В настоящее время *D. melanogaster* — один из наиболее изученных видов живых организмов. А благодаря огромному арсеналу методов, позволяющих довольно легко манипулировать с ее геномом, дрозофила является одной из самых мощных биологических моделей. В обзоре будут рассмотрены основные современные методы исследования экспрессии и функции генов у дрозофилы.

## ТРАНСПОЗОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

В 1980-е годы Рубиным и Спрадлингом была разработана методика транспозонного мутагенеза для дрозофилы с использованием Р-элемента (Rubin, Spradling, 1982). Применение этой методики позволило получать мутанты, несущие инсерции транспозона в произвольном месте генома, в том числе внутри генов. Разработке методики способствовало открытие явления, которое носит название гибридного (гонадального) дисгенеза. Гибридный дисгенез проявляется у потомства в виде повышенной частоты транспозиции мобильных элементов, что сопровождается генными и хромосомными мутациями, рекомбинацией у самцов, а также стерильностью гибридов (Kidwell, 1985). Гибридный дисгенез был описан не только для Р-элемента, но и для некоторых других транспозонов и ретротранспозонов. Скрещивания могут быть дисгенными только в том случае, если самцы несут транспозиционно активный мобильный элемент, а самки — нет. Это явление объясняется сегодня тем, что самки, имеющие в геноме копии определенного мобильного элемента, приобретают защитные механизмы, основанные на рiРНК-интерференции и подавляющие его транспозицию в тканях яичников (Duc et al., 2019).

В экспериментах Рубина и Спрадлинга на основе плазмидного вектора была получена конструкция, содержащая Р-элемент, у которого 5'- и 3'-концевые повторы, необходимые для узнавания транспозазой, были сохранены, а центральная часть (включая ген транспозазы) заменена на ген *rosy*<sup>+</sup>. Эту конструкцию инъецировали в ранние эмбрионы дрозофилы совместно с плазмидой-помощницей, экспрессирующей транспозазу, или несущую полноразмерный Р-элемент (рис. 1). Для инъекций использовали мутантные по гену *rosy* эмбрионы, в геномах которых отсутствовал Р-элемент. В данном эксперименте 8% инъецированных эмбрионов развились в фертильных имаго и 39% из них дали потомство с фенотипом *rosy*<sup>+</sup>, т.е. несли в геноме инсерцию транспозона. Далее проводили отбор мутантов по интересующему фенотипу и осуществляли поиск локализации инсерции транспозона. Таким образом, был разработан эффективный для своего времени метод исследования функции генов дрозофилы путем отбора мутантов после ненаправленного транспозонного мутагенеза.

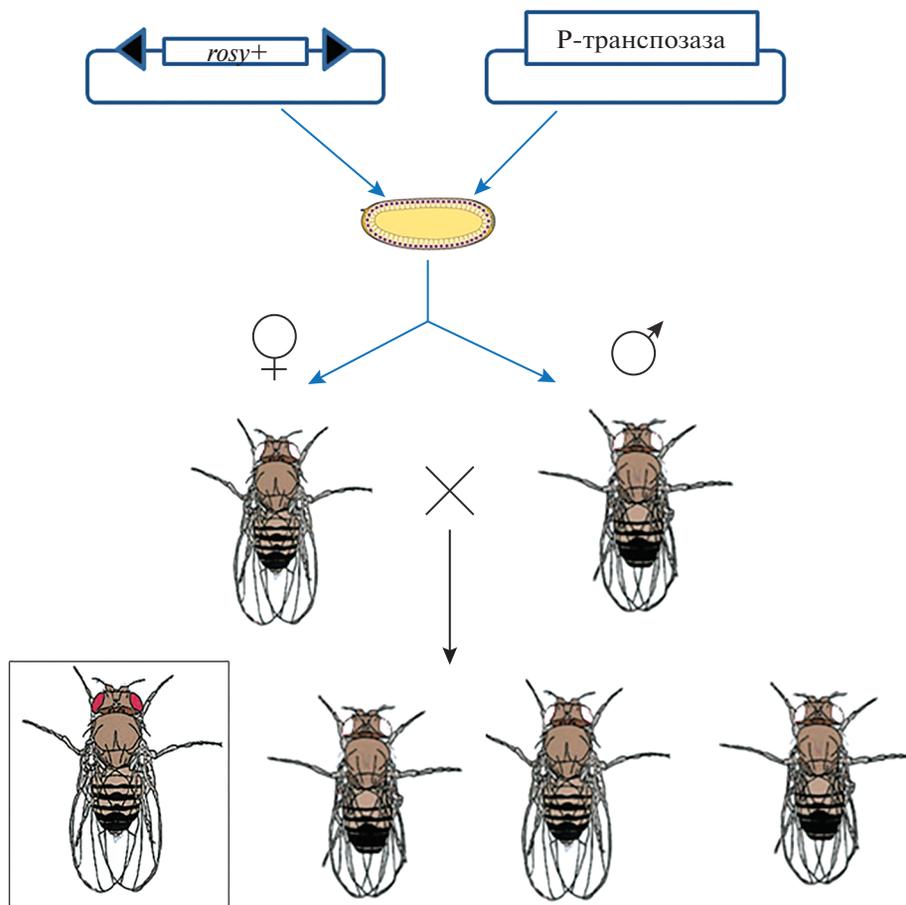
Этот метод получил дальнейшее развитие, и в ходе реализации проекта “Геном дрозофилы” (Berkeley Drosophila Genome Project, BDGP) была поставлена задача инактивировать каждый ген дрозофилы путем введения Р-элемента. В рамках этой задачи было получено более 30000 линий мух, несущих транспозон в различных участках генома. Более 6000 линий были отобраны для пополнения коллекции линий дрозофил центра

Блумингтона (Bloomington Stock Center). В совокупности около 40% генов дрозофилы на сегодняшний день содержат вставки Р-элемента в кодирующей или регуляторной части гена (Bellen et al., 2004).

Позже были разработаны аналогичные системы транспозонного мутагенеза, основанные на использовании транспозонов *Minos D. hydei* (Loukeris et al., 1995) и *piggyBack* чешуекрылых (Lobo et al., 1999). Оба транспозона не встречаются в геноме *D. melanogaster*, а, значит, используемые для трансгенеза линии *D. melanogaster* априори окажутся для них дисгенными.

## МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ GAL4/UAS: УПРАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА

Метод транспозонного мутагенеза получил широкое распространение и стал использоваться не только для выключения генов, но и для управления экспрессией клонированных генов. Транспозонный мутагенез с использованием системы GAL4/UAS был впервые применен в работе (Brand, Perrimon, 1993) для исследования функции гена *even-skipped*, участвующего в контроле сегментации у дрозофилы. Система состоит из двух конструкций, одна из которых содержит ген, кодирующий дрожжевой транскрипционный активатор GAL4, а другая — исследуемый ген, в 5'-регуляторную часть которого введен сайт связывания GAL4 — энхансер UAS (CGG-N11-CCG). Конструкции работают в двух разных трансгенных линиях мух. Одна линия — драйвер — экспрессирует GAL4 под управлением геномного энхансера, другая линия содержит исследуемый ген под регуляцией UAS (рис. 2). При скрещивании этих двух линий у гибридного потомства происходит активация исследуемого гена, которую можно осуществлять во всех клетках организма (например, воздействуя повышенной температурой, если экспрессия *GAL4* находится под контролем промотора гена теплового шока) или тканеспецифично (в том случае если *GAL4* экспрессируется в определенном типе клеток или ткани под тканеспецифичным промотором). Показано, что продукт дрожжевого гена *GAL4* не оказывает значительного влияния на фенотип мух. К настоящему времени получена коллекция линий, которые экспрессируют *GAL4* в разных тканях; эти линии так и называют — GAL4-линии. К ним относятся GMR-GAL4 (экспрессия в постмитотических клетках глаза), CG7077-GAL4 (экспрессия в пигментных клетках), sNPF-GAL4 (экспрессия в клетках центральной нервной системы), elav-GAL4 (экспрессия в нейронах мозга), e22c-GAL4 (экспрессия в фолликулярных стволовых клетках) и многие другие (более полный список см. на сайтах <http://flystocks.bio.indiana>, <http://flybase.org/>).



**Рис. 1.** Транспозонный мутагенез с использованием Р-элемента. Метод основан на коинъекции ранних эмбрионов с генотипом *white* конструкциями с геном *rosy*<sup>+</sup>, фланкированным концами Р-элемента, и с геном Р-транспозазы. Полученные после инъекции химерные особи после скрещивания с некоторой вероятностью дают потомков с розовыми глазами (трансгенный потомок выделен рамкой).

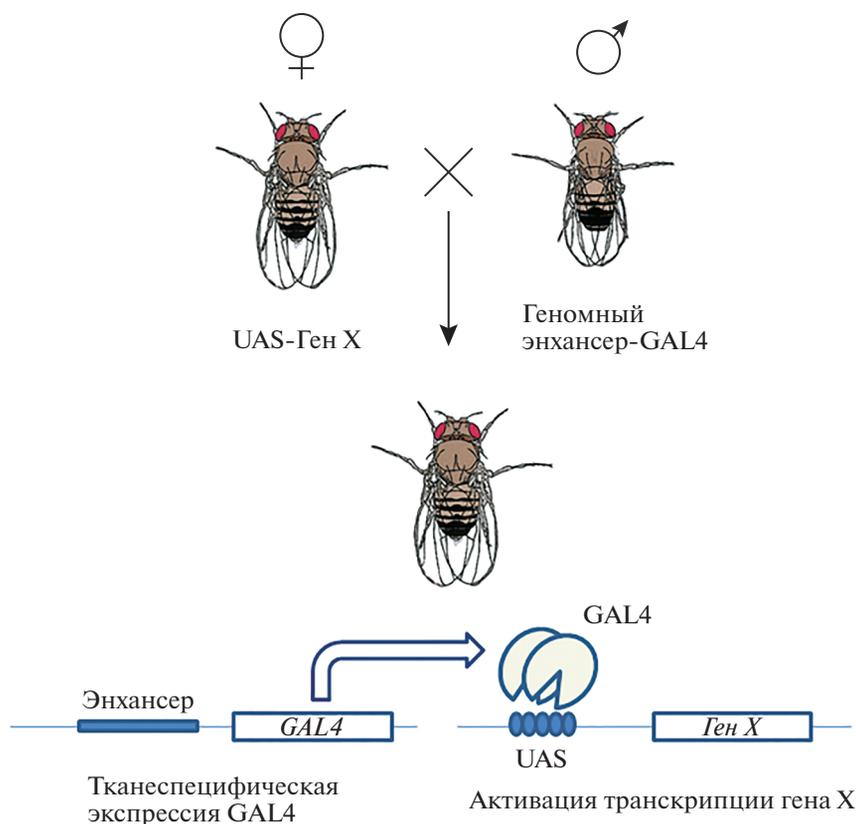
Применение системы GAL4/UAS открывает широкие перспективы для управления экспрессией генов, поскольку она позволяет избирательно (клеточно- или тканеспецифично) активировать или подавлять транскрипцию исследуемого гена. Последнее возможно при использовании линий-помощниц, экспрессирующих репрессор GAL4 – GAL80.

#### МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАЗ: ГЕННЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ЛОВУШКИ

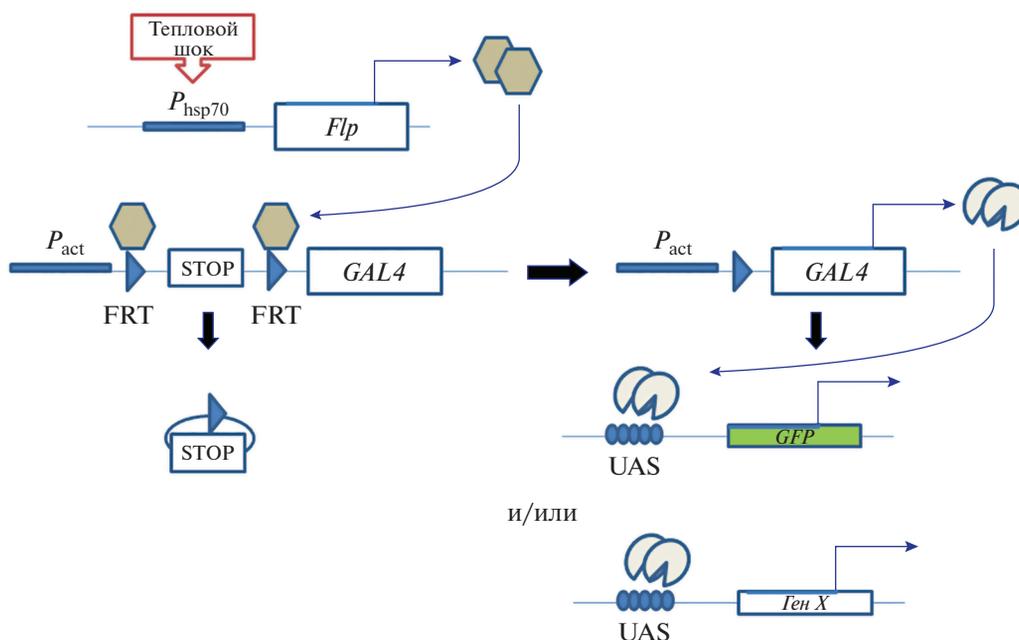
Прорывным этапом обратной генетики дрозофилы стала разработка метода сайт-специфической интеграции заданной последовательности в геном. Эта методика первоначально предназначалась для генома мыши (Branda, Dumeski, 2004). Для дрозофилы были адаптированы системы Flp-FRT (Golic, Golic, 1996), PhiC31 (Groth et al., 2004) и Cre-Lox (Nakazawa et al., 2012).

Система рекомбинации Cre-Lox бактериофага P1 состоит из фермента рекомбиназы Cre, которая узнает две короткие последовательности-мишени, LoxP, и осуществляет рекомбинацию между ними. Система рекомбинации Flp-FRT из 2-микронной плазмиды дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* аналогична Cre-Lox, и включает рекомбиназу (флиппазу) Flp, которая осуществляет рекомбинацию между сайтами-мишенями, FRT. На основе этих двух систем получены трансгенные линии дрозофилы, несущие ген рекомбиназы и сайты узнавания (рис. 3).

Сравнительный анализ эффективности “нокаута” генов с использованием рекомбиназ Flp и Cre у *D. melanogaster* был проведен в работе (Frickenhaus et al., 2015). Авторы использовали системы GAL4/UAS-Flp и GAL4/UAS-Cre для специфической экспрессии соответствующих рекомбиназ в нейронах и в мышцах с целью инактивации гена *cabeza*. Авторы пришли к выводу, что как инструмент “нокаута” рекомбиназа Flp более эффективна, чем рекомбиназа Cre, что они связали с недостаточной экспрессией Cre в



**Рис. 2.** Метод управления экспрессией гена с использованием системы GAL4/UAS. При скрещивании линий, одна из которых содержит в геноме исследуемый ген X под контролем дрожжевого энхансера UAS, а другая – GAL4 под контролем геномного энхансера, у гибридов происходит активация транскрипции исследуемого гена. Вместо последовательности гена X в геном линии UAS может быть интегрирована конструкция для подавления экспрессии гена X путем РНК-интерференции.



**Рис. 3.** Один из возможных подходов управления экспрессией генов с использованием системы рекомбинации Flp/FRT. В данном примере флипаза Flp находится под контролем промотора гена теплового шока, индукция экспрессии Flp приводит к рекомбинации по сайтам FRT, что активирует экспрессию гена GAL4, находящуюся под контролем промотора гена актина. Продукт GAL4, в свою очередь, запускает экспрессию гена флуоресцентного белка и/или исследуемого гена X.

исследуемых клетках. Кроме того, авторы обнаружили токсичность белка *Cte* для дрозофилы, что не наблюдается при использовании белка *Flp*.

Система рекомбинации *Flp-FRT* была использована для получения хромосомных перестроек у дрозофилы. Усилия проектов консорциумов *DrosDel* (Bloomington Drosophila Stock Center) и *Exelixis* были направлены на получение делеционных мутаций по нескольким тысячам генов. Для получения перестроек была использована коллекция линий, несущих инсерции *FRT*-сайтов, между которыми проводили массовые скрещивания. Так, в ходе реализации проекта *DrosDel* была получена библиотека делеционных мутаций, в совокупности покрывающих около 80% генома (Ryder et al., 2007). Всего в ходе реализации проектов *DrosDel* и *Exelixis* было получено более 500000 делеций, размером от 1 пн до 1 млн пн.

Система рекомбинации фага *phiC31* оказалась особенно полезным инструментом для получения линий трансгенных мух, поскольку наиболее эффективно позволяет вставлять различные трансгенные последовательности в один и тот же сайт в геноме (Groth et al., 2004; Bischof et al., 2007). *PhiC31* кодирует интегразу, обеспечивающую рекомбинацию между сайтами *attP* и *attB*. При рекомбинации между сайтами *attP* и *attB* образуются гибридные сайты *attL* и *attR*, которые ферментом не узнаются. К настоящему времени получен набор линий, содержащих сайты посадки интегразы по всему геному и доступных в различных коллекционных центрах (Knapp et al., 2015). Недавно была получена мутантная интеграса *phiC31*, которая способна осуществлять не только интеграцию, но и эксцизию (вырезание) по сайтам узнавания, что полезно для получения комбинаций различных трансгенов в пределах одного гена.

С использованием рекомбинации *phiC31* был разработан метод обмена кассет, опосредованного рекомбиназой (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) (Bateman et al., 2006). При использовании такого подхода сайт геномной посадки, содержащий маркерный ген, фланкированный сайтами *attP*, может быть заменен любой другой последовательностью ДНК через плазмиду, содержащую интересующий ген, фланкированный сайтами *attB* (рис. 4а). Важно отметить, что эта технология позволяет интегрировать в геном даже немаркированные конструкции в дрозофилу, т.е. даже те, в которых отсутствуют функциональные гены, а содержатся регуляторные или служебные последовательности (например, множественные сайты клонирования).

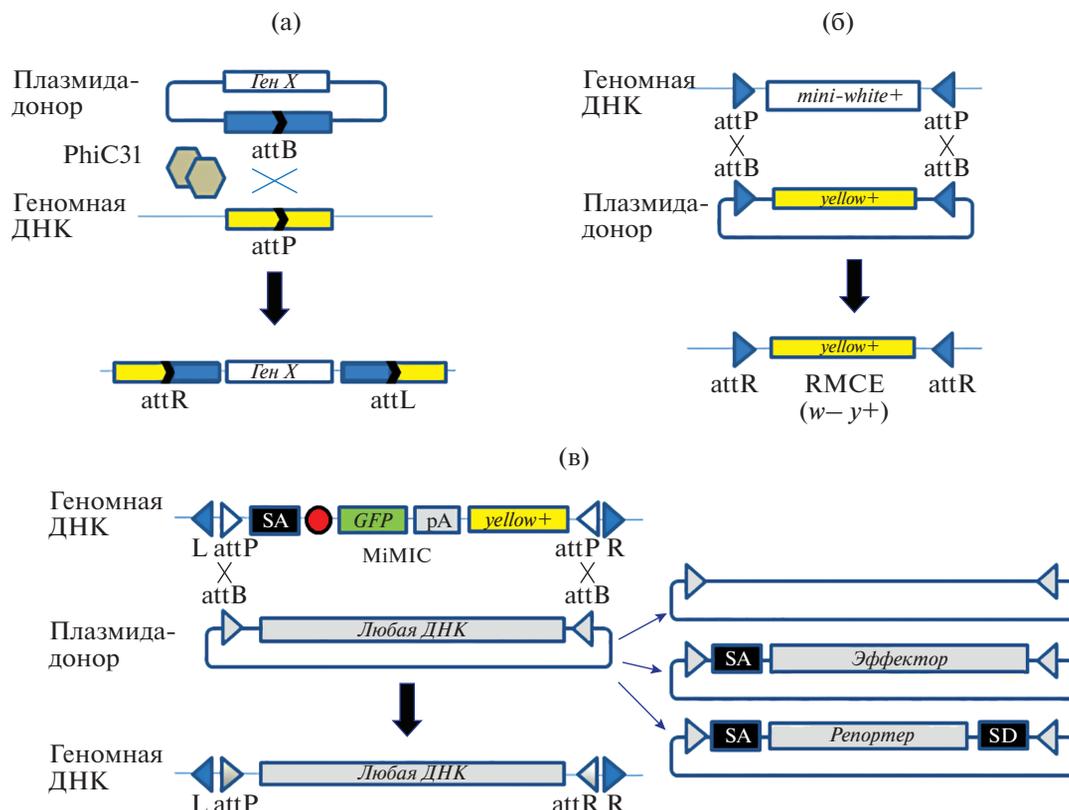
Одной из наиболее полезных и гибких стратегий, основанных на транспозонах и системе RMCE, является система *MiMIC* (Minos-mediated integration cassette) (Venken et al., 2011). Конструкция

*MiMIC* содержит транспозон *Minos*, фланкированный двумя инвертированными сайтами узнавания рекомбиназы *phiC31*, *attP*, внутрь которого вставлены кассеты с генной ловушкой – геном зеленого флуоресцентного белка *GFP* – и селективным маркером *yellow<sup>+</sup>*, а непосредственно перед ними локализованы акцепторный сайт сплайсинга и стоп-кодоны в трех рамках считывания. Сайты *attP* позволяют заменить внутреннюю последовательность транспозона любой другой последовательностью через опосредованный рекомбиназой обмен кассет (RMCE) (рис. 4б). Вставка конструкции *MiMIC* в правильной ориентации в интрон кодирующего гена будет способствовать трансляции усеченного белка из-за наличия акцептора сплайсинга и стоп-кодонов, таким образом, вставка будет действовать в качестве генной ловушки. Уникальность системы *MiMIC* – это возможность вводить в состав последовательностей исследуемого гена регуляторные гены, такой как *GAL4* или *Flp*, и функциональные репортеры, например *GFP* (рис. 4в).

В работе (Venken et al., 2011) была получена коллекция из более чем 6000 инсерций *MiMIC* в регуляторные последовательности и интроны генов. Примерно 2000 генов в настоящее время имеют *MiMIC*-вставки в интронах, но применение технологии CRISPR (см. ниже) для введения вставок *MiMIC* в геном, как предполагается, может сильно расширить возможности метода.

Метод белковой ловушки (protein trapping) основан на применении конструкций *MiMIC*, которые несут последовательность флуоресцентного белка, фланкированную SA и DS. Если такая конструкция встраивается в интрон, репортер (обычно ген *GFP*) попадает в одну рамку считывания с “захваченным” геном (рис. 4в). Этот подход был успешно использован у ряда модельных организмов, в том числе у дрозофилы, для которой созданы коллекции линий мух, экспрессирующих *GFP* в составе конструкции *MiMIC*, встроенных в интроны разных генов.

*GFP*-ловушки в основном используются для изучения характера экспрессии захваченных генов или клеточной локализации их белковых продуктов. *GFP*-ловушка также может быть использована для подавления посредством РНК-интерференции транскрипции гена, слитых в одной рамке с *GFP*. Этот метод называют “тег-опосредованной потерей функции” (tag-mediated loss-of-function), он устраняет основные недостатки классического подхода нокдауна с использованием РНК-интерференции, в котором ген-специфические последовательности являются мишенями для малых РНК. В работе (Neumüller et al., 2012) было проведено исследование материнского эффекта нескольких генов (*Spt6*, *Cp1*, *Pabp2* и *par-6*) в эмбриогенезе путем тканеспецифичного



**Рис. 4.** Методы управления экспрессией гена с использованием системы рекомбинации PhiC31. (а) Ген X может быть встроен в геном, в определенный сайт которого предварительно встроены сайты узнавания PhiC31 – attP. Для запуска процесса рекомбинации используют систему скрещиваний линий мух, несущих ген рекомбиназы PhiC31 и сайты ее узнавания, и плазмиду-донор трансгена. (б) Схема замещения гена *mini-white+* на ген *yellow+* с использованием донорной плазмиды – метод RCME. (в) Система MiMIC. Конструкция состоит из двух инвертированных повторов транспозона Minos (L и R), двух инвертированных сайтов attP PhiC31 (P), кассеты-ловушки для гена, состоящей из акцепторного сайта сплайсинга (SA), за которым следуют стоп-кодоны в трех рамках считывания (красный круг), ген GFP с сигналом полиаденилирования (pA) и ген *yellow+*. Последовательность между сайтами attP может быть заменена через RCME, в результате чего два образуются гибридные сайты attR. Плазмидой-донором для RCME может служить плазмиды, состоящая из полилинкерного сайта для клонирования, плазмиды с геном-эффектором (например, *GAL4*), слитым с SA, или плазмиды-“белковая ловушка”, состоящая из репортера (например, *GFP*), фланкированного SA и донорным сайтом сплайсинга (SD).

выключения вышеописанным методом транскрипции генов в клетках зародышевой линии.

#### РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ: НОКДАУН ГЕНА

РНК-интерференция (РНКи) является эндогенным клеточным механизмом, запускаемым двухцепочечной РНК (дцРНК), которая приводит к деградации гомологичных ей РНК и подавлению экспрессии гена на посттранскрипционном уровне (Ameres, Zamore, 2013). Механизм РНКи был впервые обнаружен в *Caenorhabditis elegans*, но потом был открыт в клетках многих эукариот: у животных, растений и грибов.

Детальное исследование механизмов РНКи позволило разработать ряд подходов, использующих РНКи для направленного выключения экспрессии гена – нокдауна гена. РНКи как механизм подавления экспрессии генов у дрозофилы

был впервые применен путем прямой инъекции дцРНК в ранние эмбрионы для исследования роли генов *Frizzled* и *Frizzled2* в ходе раннего развития эмбрионов (Kennerdell, Carthew, 1998). Позже были получены коллекции линий мух, экспрессирующие короткие дцРНК-шпильки (shRNA), комплементарные определенным генам. дцРНК-шпильки экспрессируется под контролем системы Gal4/UAS, позволяя направленно подавлять экспрессию гена у гибридов. Коллекция трансгенных линий для нокдауна на сегодняшний день охватывает около 12000 генов, что составляет более 80% всех известных белок-кодирующих генов у дрозофилы. Коллекции доступны в Гарвардском центре – Harvard Drosophila RNAi Screening Center (DRSC) (Ramadan et al., 2007) и Венском центре – Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) (Dietzl et al., 2007).

РНКи приводит к направленной деградации определенной мРНК в цитоплазме, процесс, который как правило, приводит к снижению экспрессии гена, но не к полному отсутствию экспрессии гена. Недавний анализ эффективности нокдауна гена методом РНК и показал, что 90% линий *in vivo* демонстрируют остаточную экспрессию выключаемых генов (25% или больше) (Perkins et al., 2015). Следовательно, РНКи обычно приводит к гипоморфному фенотипу, при котором количество продукта, кодируемого геном, значительно уменьшается, но не отсутствует полностью. Это может быть преимуществом, например, для изучения жизненно важных генов, полное выключение которых летально для организма. Однако в некоторых случаях, гипоморфный фенотип мешает исследованию, например, в том случае, если ген в норме экспрессируется на низком или очень низком уровне. Особенно сложно управлять экспрессией генов во время индивидуального развития, когда экспрессия будет сильно зависеть от возраста.

РНКи обычно приводит к нокдауну с примерно одинаковой эффективностью во всех GAL4-экспрессирующих клетках, хотя в некоторых случаях могут наблюдаться мозаичные эффекты (Bosch et al., 2016). Эффективность РНКи ограничена концентрациями молекул малых РНК. Таким образом, эффект РНКи нестабилен и прекращается после прекращения синтеза дцРНК. Побочные эффекты РНКи могут возникать в случае, когда вводимая молекула РНК имеет последовательность, комплементарную нескольким генам одновременно, что приводит к снижению экспрессии сразу нескольких генов. В настоящее время разработан целый ряд компьютерных программ, позволяющих подбирать интерферирующие РНК с высокой степенью надежности. Хорошие результаты дает использование методики “тег-опосредованной потери функции гена”, когда исследуемый ген сливают в одной рамке трансляции с геном GFP, и для РНКи используют малые интерферирующие РНК против GFP (Neumüller et al., 2012).

### САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА

Важным этапом обратной генетики стала разработка метода направленной инактивации генов с использованием бактериальной системы CRISPR/Cas9. РНК, транскрибирующиеся с локуса CRISPR (сгРНК), вступают в комплекс с транс-кодируемыми CRISPR-РНК (tracrРНК) и с ферментом каспазой Cas9. Комплекс связывается с комплементарной ДНК, которую каспаза разрушает. Для проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9 малые РНК объ-

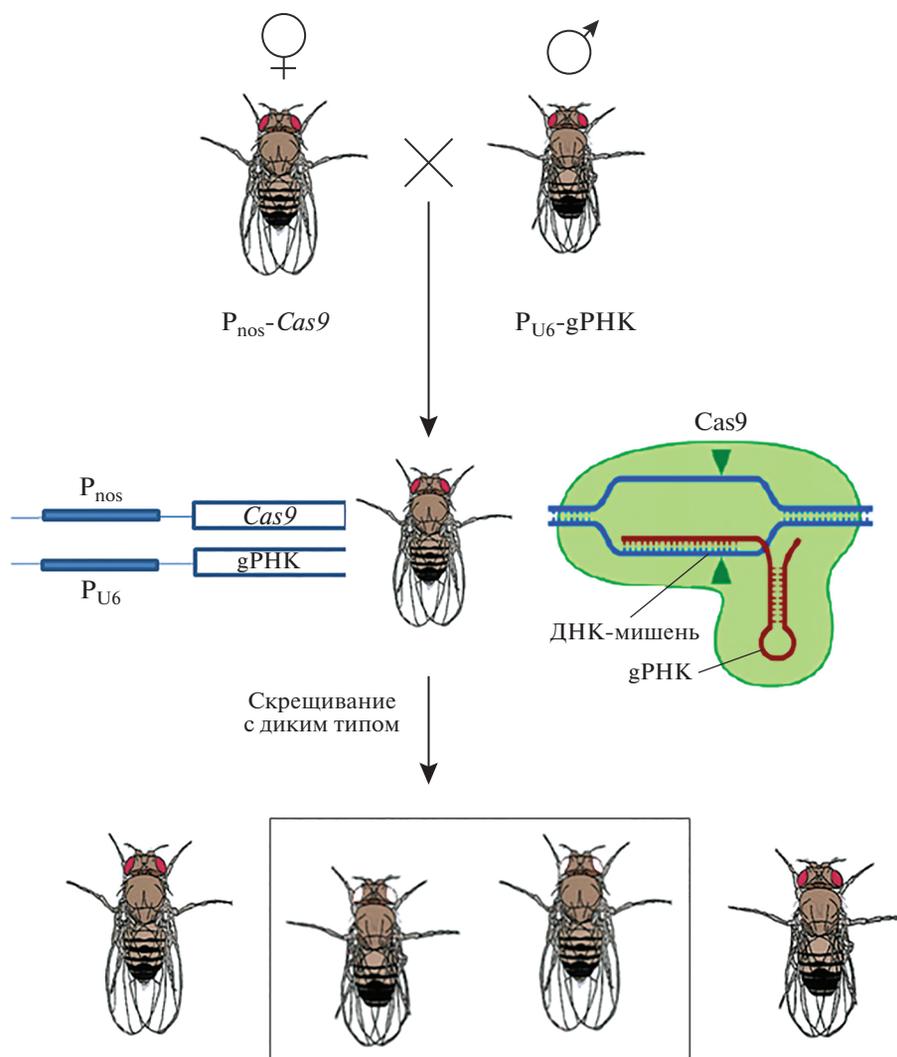
единяют в одну, которую называют гидовой РНК (gРНК).

Недавно получены трансгенные линии дрозофилы, экспрессирующие Cas9 под контролем промоторов генов *nanos (nos)* или *vasa* (рис. 5). Эти линии использовали в качестве реципиентов для инъекции плазмид, экспрессирующих gРНК под промотором малой ядерной РНК U6, что позволило значительно повысить эффективность метода (Kondo, Ueda, 2013; Port et al., 2014).

Самый простой способ модификации гена на основе технологии CRISPR/Cas9 – это введение коротких вставок/делеций (индел) путем стимулирования негомологичного соединения концов ДНК, которое часто приводит к мутациям сдвига рамки считывания и, следовательно, к выключению гена или синтезу усеченного белка. Поскольку размер индел является случайным, значительное количество клеток будет содержать мутации, которые не нарушают функцию гена. В результате, полученные особи – это, как правило, генетические мозаики, состоящие из клеток с двумя, с одной или без функциональной копии нокаут-руемого гена (Port et al., 2014).

Недавно показано, что несколько событий CRISPR могут происходить в одной клетке одновременно. Метод ко-CRISPR или метод совместной конверсии, первоначально разработанный для *C. elegans*, успешно применен и у дрозофилы (Kane et al., 2017). Метод основан на одновременной инъекции эмбрионов pos-Cas9 смесью gРНК к интересующему гену и селективному маркеру – гену *ebony*. Ожидается, что в любой клетке, в которой будет выключен *ebony*, следует ожидать мутации в исследуемом гене. Таким образом, потомство, демонстрирующее потерю *ebony*, отбирают для молекулярного анализа целевого гена (Kane et al., 2017).

Использование каспазы Cas9, сшитой с флуоресцентным белком, лежит в основе нового метода CASFISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*, опосредуемой CRISPR-Cas9), который позволяет флуоресцентно метить локусы-мишени (Port et al., 2014). Каспазу можно использовать для подавления транскрипции гена-мишени (в случае, когда она связывается с ним в области промотора, регуляторных областей или начала кодирующей области); кроме того, для подавления транскрипции к каспазе может быть пришит репрессор или активатор транскрипции. Введенные белковые метки могут быть не только регуляторами, но и репортерами, например, флуоресцентными белками (YFP, GFP, mCherry и т.д.) или эпитопами (FLAG, STREPII, Мус и т.д.) (Thorn, 2017). Меченые белки можно визуализировать *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии или иммуногистохимии, а эпитомы также можно использовать в биохимических исследованиях, например, в комплексной очистке целевого белка.



**Рис. 5.** Метод нокаута гена, с использованием системы CRISPR/Cas9. Активация системы происходит у гибридов при скрещивании самок, экспрессирующих Cas9 под промотором гена *nos*, с самцами, экспрессирующими гидовую РНК под промотором U6. Полученные гибриды после скрещивания с диким типом могут давать потомков с выключенным исследуемым геном, например, геном *white* (мутантные потомки выделены рамкой).

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Секвенирование транскриптомов отдельных клеток (single cell RNA-sequencing, scRNA-seq) — чрезвычайно важный подход в онтогенетических исследованиях. С помощью него уже удалось провести общий анализ раннего развития млекопитающих. Для нематоды *C. elegans* был составлен молекулярный атлас эмбрионального развития с клеточным разрешением. Дрозофила не стала исключением. Одна из первых работ, сделанных с применением секвенирования РНК единичных клеток, была посвящена исследованию механизма дозовой компенсации в ходе раннего эмбрионального развития (Lott et al., 2011).

Не менее перспективными представляются исследования развития центральной нервной си-

стемы, включая головной мозг. Мозг дрозофилы содержит около 100000 нейронов, количество их предшественников — примерно 200 нейробластов. Управление развитием может быть представлено в виде сети. Чтобы исследовать транскрипционные сети, лежащие в основе развития различных линий нейробластов, в работе (Yang et al., 2016) поместили и выделили нейробласты, специфичные для отдельных клеточных линий, и секвенировали их транскриптомы. Конкретные нейробласты были маркированы с использованием системы GAL4/UAS и отслеживались на протяжении всего нейрогенеза.

Крыловой имагинальный диск дрозофилы является важной модельной системой для изучения роста ткани, морфогенеза эпителия, межклеточной передачи сигналов, клеточной конкуренции и др. Паттерны экспрессии подавляющего боль-

**Таблица 1.** Процессы развития, моделируемые на дрозофиле с использованием новых генетических технологий

| Биологический процесс            | Ссылки на публикации  |
|----------------------------------|---|
| Оогенез                          | Gaziova et al., 2004;<br>Hudson, Cooley, 2014;<br>Rubin, Huynh, 2015;<br>Rodal et al., 2015;<br>Hsu et al., 2019  |
| Раннее эмбриональное развитие    | Lott et al., 2011;<br>Neumüller et al., 2012;<br>Fernandez, Lagha, 2019;<br>Mazina et al., 2019;<br>Weisman, 2019;<br>Zhou et al., 2019                             |
| Развитие мозга и нервной системы | Jennett et al., 2012;<br>Xue et al., 2014;<br>Frickenhaus et al., 2015;<br>Jin et al., 2016;<br>Yang et al., 2016;<br>Spirov, Myasnikova, 2019;<br>Liu et al., 2020 |
| Развитие крыла                   | Schertel et al., 2015;<br>Xu et al., 2017;<br>Bageritz et al., 2019   |
| Развитие мышц и регенерация      | Frickenhaus et al., 2015;<br>Gunage et al., 2017;<br>Kopke et al., 2020   |
| Гемопоез и развитие сердца       | Frasch, 2016;<br>Banerjee et al., 2019  |
| Развитие трахеи                  | Chandran et al., 2014;<br>Amourda, Saunders, 2017   |

шинства генов в крыловом диске неизвестны. Чтобы получить полный атлас экспрессии генов в крыловом диске, в работе (Bageritz et al., 2019) использовали секвенирование отдельных клеток и разработали новый метод анализа данных scRNA-seq, основанный на корреляциях экспрессии генов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вековая история дрозофилы в биологии сопровождается постоянным расширением новых методов манипуляции с геномом, получением коллекций доступных для исследователей трансгенных линий, которые насчитывают более 100000. Создаются и постоянно обновляются базы данных геномных и генетических ресурсов дрозофилы, расширяются биоинформатические подходы к анализу генома. С расширением методической базы расширяются и возможности использования дрозофилы как модели для изучения отдельных процессов развития. В табл. 1 перечислены некоторые примеры использования дрозофилы как модели с применением вышеописанных технологий в последние годы. Все это позволяет заключить,

что дрозофила, в ближайшее время будет по-прежнему востребована как объект исследований в генетике развития.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит д. б. н. О.Б. Симонову за плодотворное обсуждение статьи.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках программы НИР биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова “Молекулярно-генетические механизмы нестабильности генома и мутагенеза у животных и человека” (АААА-А16-116021660038-4).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ameres S.L., Zamore P.D.* Diversifying microRNA sequence and function // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 8. P. 475–488.
- Amourda C., Saunders T.E.* Gene expression boundary scaling and organ size regulation in the *Drosophila* embryo // *Dev. Growth Differ.* 2017. V. 59. № 1. P. 21–32.
- Bageritz J., Willnow P., Valentini E. et al.* Gene expression atlas of a developing tissue by single cell expression correlation analysis // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. № 8. P. 750–756.
- Banerjee U., Girard J.R., Goins L.M. et al.* *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis // *Genetics.* 2019. V. 211. № 2. P. 367–417.
- Bateman J.R., Lee A.M., Wu C.T.* Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange // *Genetics.* 2006. V. 173. P. 769–777.
- Bellen H.J., Levis R.W., Liao G. et al.* The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes // *Genetics.* 2004. V. 167. № 2. P. 761–781.
- Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al.* An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific PhiC31 integrases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 3312–3317.
- Bosch J.A., Sumabat T.M., Hariharan I.K.* Persistence of RNAi-mediated knockdown in *Drosophila* complicates mosaic analysis yet enables highly sensitive lineage tracing // *Genetics.* 2016. V. 203. № 1. P. 109–118.
- Brand A.H., Perrimon N.* Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
- Branda C.S., Dymecki S.M.* Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice // *Dev. Cell.* 2004. V. 6. № 1. P. 7–28.
- Chandran R.R., Iordanou E., Ajja C. et al.* Gene expression profiling of *Drosophila* tracheal fusion cells // *Gene Expr. Patterns.* 2014. V. 15. № 2. P. 112–123.
- Dietzl G., Chen D., Schnorrrer F. et al.* A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* // *Nature.* 2007. V. 448. № 7150. P. 151–156.
- Duc C., Yoth M., Jensen S. et al.* Trapping a somatic endogenous retrovirus into a germline piRNA cluster immunizes the germline against further invasion // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 127.
- Ewen-Campen B., Yang-Zhou D., Fernandes V.R. et al.* Optimized strategy for in vivo cas9-activation in *Drosophila* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. P. 9409–9414.
- Fernandez C., Lagha M.* Lighting up gene activation in living *Drosophila* embryos // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2038. P. 63–74.
- Frasch M.* Genome-wide approaches to *Drosophila* heart development // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2016. V. 3. № 2. pii:20.
- Frickenhaus M., Wagner M., Mallik M. et al.* Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the *Drosophila* FUS homolog *cabeza* in neurons // *Scientific Reports.* 2015. V. 5. P. 9107.
- Gaziova I., Bonnette P.C., Henrich V.C., Jindra M.* Cell-autonomous roles of the ecdysoneless gene in *Drosophila* development and oogenesis // *Development.* 2004. V. 131. № 11. P. 2715–2725.
- Golic K.G., Golic M.M.* Engineering the *Drosophila* genome: Chromosome rearrangements by design // *Genetics.* 1996. V. 144. P. 1693–1711.
- Groth A.C., Fish M., Nusse R. et al.* Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage PhiC31 // *Genetics.* 2004. V. 166. P. 1775–1782.
- Gunage R.D., Dhanyasi N., Reichert H. et al.* *Drosophila* adult muscle development and regeneration // *Semin Cell Dev. Biol.* 2017. V. 72. P. 56–66.
- Hsu H.J., Bahader M., Lai C.M.* Molecular control of the female germline stem cell niche size in *Drosophila* // *Cell Mol. Life Sci.* 2019. V. 76. № 21. P. 4309–4317.
- Hudson A.M., Cooley L.* Methods for studying oogenesis // *Methods.* 2014. V. 68. № 1. P. 207–217.
- Jennett A., Rubin G., Ngo T. et al.* A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 4. P. 991–1001.
- Jin M., Eblimit A., Pulikkathara M. et al.* Conditional knockout of retinal determination genes in differentiating cells in *Drosophila* // *FEBS J.* 2016. V. 283. № 15. P. 2754–2766.
- Kane N.S., Vora M., Varre K.J. et al.* Efficient screening of CRISPR/Cas9-induced events in *Drosophila* using a co-CRISPR strategy // *G3 Genes Genomes Genet.* 2017. V. 7. P. 87–93.
- Kennerdell J.R., Carthew R.W.* Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway // *Cell.* 1998. V. 95. № 7. P. 1017–1026.
- Kidwell M.G.* Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: nature and inheritance of P element regulation // *Genetics.* 1985. V. 111. P. 337–350.
- Knapp J.M., Chung P., Simpson J.H.* Generating customized transgene landing sites and multi-transgene arrays in *Drosophila* using PhiC31 integrase // *Genetics.* 2015. V. 199. P. 919–934.
- Kondo S., Ueda R.* Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila* // *Genetics.* 2013. V. 195. P. 715–721.
- Kopke D.L., Leahy S.N., Vita D.J. et al.* Carrier of wingless (cow) regulation of *Drosophila* neuromuscular junction development // *eNeuro.* 2020. pii: ENEURO.0285-19.2020.
- Lee T., Luo L.* Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. № 5. P. 251–254.
- Liu Z., Chen Y., Rao Y.* An RNAi screen for secreted factors and cell-surface players in coordinating neuron and glia development in *Drosophila* // *Mol. Brain.* 2020. V. 13. № 1. P. 1.
- Lobo N., Li X., Fraser M.J.* Transposition of the piggybac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni* // *Mol. Gen. Genet.* 1999. V. 261. P. 803–810.
- Lott S.E., Villalta J.E., Schroth G.P. et al.* Noncanonical compensation of zygotic X transcription in early *Drosophila melanogaster* development revealed through single-embryo RNA-seq // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 2. e1000590.
- Loukeris T.G., Arcà B., Livadaras I. et al.* Introduction of the transposable element *minos* into the germ line of *Dro-*

- sophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 9485–9489.
- Mazina M.Y., Krasnov A.N., Georgiev P.G. et al. The development of reporter system for the investigation of molecular mechanisms of ecdysone response // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 485. № 1. P. 138–140.
- McGuire S.E., Roman G., Davis R.L. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space // Trends Genet. 2004. V. 20. № 8. P. 384–391.
- Weisman N.Ya. Genetic and Epigenetic Pathways of lethal (2) giant larvae Tumor Suppressor in *Drosophila melanogaster* // Russian J. Genetics. 2019. V. 55. № 2. P. 133–143.
- Nagarkar-Jaiswal S., DeLuca S.Z., Lee P.-T. et al. A genetic toolkit for tagging intronic MiMIC containing genes // Elife. 2015. V. 4. e08469.
- Nakazawa N., Taniguchi K., Okumura T. et al. A novel cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo // Dev. Dyn. 2012. V. 241. P. 965–974.
- Neumüller R.A., Wirtz-Peitz F., Lee S. et al. Stringent analysis of gene function and protein-protein interactions using fluorescently tagged genes // Genetics. 2012. V. 190. № 3. P. 931–940.
- Perkins L.A., Holderbaum L., Tao R. et al. The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation // Genetics. 2015. V. 201. № 3. P. 843–852.
- Port F., Chen H.M., Lee T. et al. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. E2967–E2976.
- Ramadan N., Flockhart I., Booker M. et al. Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells // Nat. Protoc. 2007. V. 2. № 9. P. 2245–2264.
- Riggleman B., Wieschaus E., Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus: Uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene // Genes Dev. 1989. V. 3. P. 96–113.
- Rodal A.A., Del Signore S.J., Martin A.C. *Drosophila* comes of age as a model system for understanding the function of cytoskeletal proteins in cells, tissues, and organisms // Cytoskeleton (Hoboken). 2015. V. 72. № 5. P. 207–224.
- Rong Y.S. Gene targeting by homologous recombination: a powerful addition to the genetic arsenal for *Drosophila* geneticists // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 297. № 1. P. 1–5.
- Rubin G.M., Spradling A.C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors // Science. 1982. V. 218. P. 348–353.
- Rubin T., Huynh J.R. Mosaic Analysis in the *Drosophila melanogaster* ovary // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1328. P. 29–55.
- Ryder E., Ashburner M., Bautista-Llacer R. et al. The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genome-wide chromosomal deficiency resource // Genetics. 2007. V. 177. P. 615–629.
- Ryder E., Russell S. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila* // Brief Funct. Genomic Proteomic. 2003. V. 2. № 1. P. 57–71.
- Schertel C., Albacara M., Rockel-Bauer C. et al. A large-scale, in vivo transcription factor screen defines bivalent chromatin as a key property of regulatory factors mediating *Drosophila* wing development // Genome Res. 2015. V. 25. № 4. P. 514–523.
- Spirov A.V., Myasnikova E.M. Evolutionary stability of gene regulatory networks that define the temporal identity of neuroblasts // Mol. Biol. (Mosk.). 2019. V. 53. № 2. P. 225–239.
- Theodosiou N.A., Xu T. Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development // Methods. 1998. V. 14. № 4. P. 355–365.
- Thorn K. Genetically encoded fluorescent tags // Mol. Biol. Cell. 2017. V. 28. P. 848–857.
- Venken K.J., Schulze K.L., Haelterman N.A. et al. MiMIC: A highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes // Nat. Methods. 2011. V. 8. P. 737–743.
- Xu X.S., Gantz V.M., Siomava N. et al. CRISPR/Cas9 and active genetics-based trans-species replacement of the endogenous *Drosophila* kni-L2 CRM reveals unexpected complexity // Elife. 2017. V. 6. pii:e30281.
- Xue Z., Ren M., Wu M. et al. Efficient gene knock-out and knock-in with transgenic Cas9 in *Drosophila* // G3 (Bethesda). 2014. V. 4. № 5. P. 925–929.
- Yang C.P., Fu C.C., Sugino K. et al. Transcriptomes of lineage-specific *Drosophila* neuroblasts profiled by genetic targeting and robotic sorting // Development. 2016. V. 143. № 3. P. 411–421.
- Zhou J., Schor I.E., Yao V. et al. Accurate genome-wide predictions of spatio-temporal gene expression during embryonic development // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 9. e1008382.

## ***Drosophila melanogaster* as a Model of Development Genetics: Modern Approaches and Prospects**

**L. N. Nefedova\***

*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

*\*e-mail: lidia\_nefedova@mail.ru*

For more than a hundred years, the fruit fly *Drosophila melanogaster* has successfully served as a universal model in various genetic studies, including studies of the genetic control of individual development. To date, a whole arsenal of reverse genetics methods has been developed for *Drosophila*, making it quite easy to manipulate its genome, which allows *Drosophila* to be considered one of the most powerful models of developmental genetics. The review considers the main modern methods for studying the expression and function of genes in *Drosophila* and the prospects for their use.

**Keywords:** *Drosophila*, developmental genetics, model, gene expression

УДК 576.08

## РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА: СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2020 г. Л. А. Ржанова<sup>а, \*</sup>, А. В. Кузнецова<sup>а</sup>, М. А. Александрова<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: 9303923@gmail.com

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.

После доработки 04.02.2020 г.

Принята к публикации 07.02.2020 г.

Нарушение гомеостатической и функциональной целостности сетчатки и ретиального пигментного эпителия (РПЭ) является основной причиной ряда дегенеративных заболеваний глаза человека, сопровождающихся потерей зрения. Несмотря на значительные успехи, достигнутые за последние десятилетия, в разработке новых методов лечения указанной патологии, сохраняется ряд осложнений при использовании хирургических способов коррекции зрения и пока непреодолимых ограничений в применении современных подходов, например, генной терапии и генной инженерии. Одним из перспективных подходов к лечению дегенеративных заболеваний сетчатки может оказаться подход, основанный на использовании регенеративных способностей собственных эндогенных клеток с высокой пластичностью, в частности клеток РПЭ и Мюллеровской глии. В настоящее время клетки РПЭ позвоночных вызывают огромный интерес в качестве источника новых фоторецепторов и других нейронов в деградирующей сетчатке *in vivo*. В связи с этим исследуются возможности их прямого репрограммирования генетическими, эпигенетическими, химическими методами и их комбинацией. В обзоре сделан акцент на исследованиях по генетическому прямому репрограммированию клеток РПЭ позвоночных в нейроны сетчатки, с подробным анализом используемых генов в качестве основных репрограммирующих факторов, сравнительным анализом и экстраполяцией экспериментальных данных с животных на человека. Кроме того, обзор затрагивает работы по использованию альтернативных генетическому прямому репрограммированию подходов – химически-опосредованного с применением коктейлей из терапевтических низкомолекулярных соединений и микроРНК. В целом, результаты исследований указывают на сложность процесса прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки. Однако, учитывая результаты по прямому репрограммированию клеток позвоночных и доступность клеток РПЭ человека для различных векторов, доставляющих в клетки разнообразные молекулы: транскрипционные факторы, химерные эндонуклеазы, рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения, можно предположить наиболее оптимальный набор факторов для успешной конверсии клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки.

**Ключевые слова:** ретиальный пигментный эпителий, РПЭ, регенерация сетчатки, генетическое прямое репрограммирование, гены, транскрипционные факторы, дегенеративно-дистрофические заболевания глаза

**DOI:** 10.31857/S0475145020040060

### ВВЕДЕНИЕ. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ СЕТЧАТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА

Дегенерация сетчатки в результате гибели фоторецепторов, специализированных клеток, обеспечивающих фототрансдукцию, и ретиального пигментного эпителия (РПЭ) является основной причиной многих дегенеративно-дистрофических

заболеваний глаза человека, приводящих к потере зрения (Fu et al., 2018). В настоящее время в современной медицине для коррекции зрения при указанной патологии активно разрабатываются подходы, направленные на сохранение исходных фоторецепторов и РПЭ (Jiang et al., 2018), замену клеток путем активации эндогенной регенерации (Otterson, 2017) или за счет клеточной трансплантации (Jiang et al., 2018; Léveillard, Klipfel, 2019). Все это стало возможным благодаря развитию ря-

да технологий в клеточной и молекулярной биологии. Вследствие использования вирусных и невирусных векторов для доставки функциональных генов в дефектные клетки глаза, открытия методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а из них клеток РПЭ и нейронов сетчатки для трансплантации, а также создания CRISPR/Cas9 технологии, позволило говорить о революции, происходящей в офтальмологии (Jiang et al., 2018). Так, благодаря успехам современной биоинженерии стало возможным использовать принципы генной терапии и геномной хирургии для лечения наследственных заболеваний глаз человека (Chan et al., 2017). Основная цель — заменить нефункциональные или дефектные гены новыми полнофункциональными, чтобы уровень генетической экспрессии мог вернуться к нормальному. Первый успешный клинический пример генной терапии в офтальмологии показан у пациентов с врожденным амаврозом Лебера, вызванный мутациями в гене *RPE65* (Bainbridge et al., 2008). Клинические испытания генной терапии начаты и для пациентов с болезнью Штаргардта (clinicaltrials.gov NCT01367444), синдромом Ушера (clinicaltrials.gov NCT01505062), пигментным ретинитом (clinicaltrials.gov NCT01482195) (Fu et al., 2018). Клинические испытания генной терапии, направленной на лечение заболеваний сетчатки, показали, что она безопасна и эффективна для людей (Al-Saikhan, 2013; Öner, 2017; Fu et al., 2018; Jiang et al., 2018). Однако лечение генной терапией ограничено только аутосомно-рецессивными заболеваниями. При этом в клетках остается функционально дефектный ген, который необходимо заблокировать, сделав его не функциональным или удалить. Лечение наследственных заболеваний глаз с использованием методов хирургии генома в течение последних нескольких лет развивается быстрыми темпами. С внедрением технологии CRISPR/Cas редактирования генов, которая позволяет не только заблокировать дефектный ген, но и встроить рабочий, внимание многих исследователей направлено на восстановление сетчатки и РПЭ (Burnight et al., 2017). В ближайшее время начнутся клинические испытания CRISPR/Cas9 на людях с таким офтальмологическим заболеванием, как врожденный амавроз Лебера 10 типа (clinicaltrials.gov NCT03872479). Поскольку генная терапия и геномная хирургия имеют высокий процент эффективности только на ранних стадиях развития дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки, когда еще сохранились фоторецепторы и РПЭ, многое зависит от возможности ранней диагностики заболеваний. Кроме того, эти методы не подходят для лечения других видов патологии сетчатки.

Другой подход в лечении ряда дегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе возрастной макулярной дегенерации — это заместительная

клеточная терапия. Клетки РПЭ, полученные из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и ИПСК человека уже проходят клинические испытания и имеют большие перспективы как для лечения возрастной макулярной дистрофии (Schwartz et al., 2012; Kharitonov et al., 2018; Luo, Chen, 2018; Kashani et al., 2018), так и наследственных, связанных с РПЭ, дистрофий сетчатки (Chichagova et al., 2018). Несмотря на разработанные высокоэффективные протоколы по получению клеток РПЭ в достаточном количестве для трансплантаций, они все еще остаются трудо- и времязатратными (Kharitonov et al., 2018; Artero-Castro et al., 2019). Помимо позитивного эффекта трансплантация может вызывать ряд осложнений, которые могут быть спровоцированы хирургическим повреждением сетчатки, приводящим к ее отслоению (Satarian et al., 2017), а так же самими клетками при долгосрочном выживании/интеграции, вызывая иммуносупрессию и опухолообразование (Nguyen, Wong, 2017; Öner, 2018). В дополнение к научным проблемам остаются неразрешенными морально-этические вопросы по использованию ЭСК (Schwartz et al., 2015).

Благодаря повышенному интересу к ИПСК, возможности получения из них клеток РПЭ и нейронов сетчатки для заместительной клеточной терапии, область исследования регенеративных способностей собственных эндогенных клеток с высокой пластичностью, таких как РПЭ и Мюллеровская глия, на наш взгляд, незаслуженно оказалась в тени. Хотя очевидно, что прямое репрограммирование эндогенных клеток в нейроны сетчатки может быть перспективным для лечения многих дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки глаза человека, позволяющее избежать перечисленные выше ограничения и осложнения.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ДЛЯ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

РПЭ — это однослойный эпителий, состоящий из сильнопигментированных клеток, выполняющих жизненно важные функции в физиологии сетчатки. РПЭ лежит непосредственно под сетчаткой и образует внешний гематоретинальный барьер. Такое анатомическое расположение предоставляет уникальную возможность для прямого репрограммирования клеток РПЭ в фоторецепторы и другие нейроны и регенерации дегенерирующей сетчатки без хирургического вмешательства (Wang et al., 2010).

В процессе развития РПЭ и сетчатка происходят из одной и той же структуры — глазного пузыря (Martínez-Morales et al., 2004). Образующие его клетки нейроэпителия имеют общие молекулярные характеристики, они бипотентны, и могут

дать начало как клеткам РПЭ, так и клеткам сетчатки (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014). В процессе развития глазной пузырь инвагинирует, образуя двухслойную глазную чашу, создавая анатомическое разделение РПЭ (внешний слой) и сетчатки (внутренний слой) (Martínez-Morales et al., 2004). РПЭ сохраняет свою простую однослойную эпителиальную структуру на протяжении всей жизни. В то время как сетчатка представляет собой высоко упорядоченную структуру с пятью типами нейронов, включая ганглиозные, амакриновые, биполярные, горизонтальные и фоторецепторные клетки, и одним типом глии — клетки Мюллера (Zaghloul et al., 2005; Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014). Благодаря общности происхождения в клетках РПЭ, по всей видимости, сохраняются молекулярные и клеточные особенности, которые могут способствовать переключению их клеточной судьбы при прямом репрограммировании. Так, последние исследования (Dvorianchikova et al., 2019) показали, что клетки РПЭ глаза взрослой мыши эпигенетически очень близки к фенотипам клеток-предшественников сетчатки и фоторецепторов. На основании данных, полученных с использованием ряда специфических методов (ДНК-микрочипа (DNA microarray) и методов, основанных на иммунопреципитации хроматина и полногеномном бисульфитном секвенировании (ChIP- и whole-genome bisulfite sequencing)) авторы предположили существование как минимум двух механизмов, необходимых для запуска прямого репрограммирования клеток РПЭ в нейрональные клетки сетчатки. Первый механизм заключается в ремоделировании конденсированного хроматина, в котором находятся ключевые гены клеток-предшественников и зрелых нейронов сетчатки транскрипционными пионер-факторами. Второй механизм — в деметилировании регуляторных элементов генов, связанных с фоторецепторами (Dvorianchikova et al., 2019). Можно предположить, что именно эти механизмы запускаются в клетках РПЭ у высокорегенерирующих амфибий при регенерации сетчатки, а у млекопитающих они вероятно подавлены или отсутствуют.

Классические эксперименты на животных моделях продемонстрировали способность клеток РПЭ к трансдифференцировке, естественному прямому репрограммированию, в нейральные клетки сетчатки. Процесс трансдифференцировки клеток РПЭ в нейральные клетки у низших позвоночных успешно воспроизводится *in vivo*. Так, клетки РПЭ у ряда амфибий после повреждения сетчатки репрограммируются в клетки подобные стволовым клеткам нейроэпителия, потомки которых дифференцируются во все нервные клетки сетчатки, включая фоторецепторы, глию, пигментный эпителий и полностью восстанавливают функцию сетчатки (Chiba, Mitashov, 2008; Vergara, Del Rio-

Tsonis, 2009; Grigoryan et al., 2013; Islam et al., 2014). У птиц и млекопитающих процесс конверсии РПЭ происходит в ранние периоды эмбрионального развития только под влиянием основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Luz-Madriral et al., 2014), а у взрослых особей при усилении или потери функции генов, участвующих в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки (Nguyen, Arnheiter, 2000; Bumsted, Barnstable, 2000; Martínez-Morales et al., 2003; Bäumer et al., 2003; Fujimura et al., 2009; Bassett et al., 2010; Bharti et al., 2012; Remez et al., 2017). У взрослых млекопитающих, включая человека, РПЭ может проявлять пластичность и пролиферацию. Показано, что в зрелом глазу крыс небольшая популяция клеток на периферии РПЭ поддерживает митотическую активность (Al-Hussaini et al., 2008). Клетки РПЭ, в норме находящиеся в состоянии покоя, могут повторно входить в клеточный цикл и пролиферировать при определенных состояниях, таких как отслоение сетчатки (Anderson et al., 1981), физическая стимуляция (Zhang et al., 1993), повреждение сетчатки или ее дегенерация (La Cour, 2008). Пролиферативный ответ может иметь два последствия — привести к регенерации РПЭ (Rabenlehner et al., 2008) или к пролиферативной ретинопатии, при которой клетки РПЭ трансдифференцируются в фибробластоподобные клетки, вызывающие отслоение сетчатки (Tamiya, Kaplan, 2016).

Трансдифференцировку клеток РПЭ у птиц и млекопитающих в нейроны сетчатки можно наблюдать *in vitro* при условии добавления морфогенов и факторов роста (Zhao et al., 1995; Engelhardt et al., 2005; Sakami et al., 2008; Salero et al., 2012). В культуре клетки РПЭ теряют исходные признаки, такие как пигментацию, значительно снижают экспрессию специфических маркеров RPE65, MITF, CRALBP и приобретают черты нейральных клеток по маркерам MUSASH1, NESTIN,  $\beta$ III-TUBULIN, GFAP, DOUBLECORTIN, NF 68 и 200 кДа. Наши исследования так же демонстрируют, что клетки РПЭ эмбриона и взрослого человека *in vitro* в средах с добавками морфогенов и факторов роста теряют пигментные гранулы, дедифференцируются, пролиферируют и демонстрируют маркеры нескольких типов нейральных и глиальных клеток (Milyushina et al., 2009, 2011, 2012; Kuznetsova, 2014; Kuznetsova et al., 2015, 2019). На стадии дедифференцировки клетки приобретают черты стволовых/нейроэпителиальных клеток, экспрессируя *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *OTX2*, *PAX6* и *NESTIN* (Milyushina et al., 2009, 2011, 2012; Kuznetsova et al., 2014, 2015, 2019a, 2019b). Хотя экспрессия мРНК генов-маркеров плюрипотентности проявляется на очень низком уровне в сравнении с ИПСК человека (Kuznetsova et al., 2019), активность этих генов свидетельствует, что они могут действовать, как пионер-

факторы (Kuzmich et al., 2015). Клетки РПЭ человека в условиях *in vitro* приобретают пронеуральные свойства при частичном сохранении свойств РПЭ. В культуре четко проявляется гетерогенность популяции клеток РПЭ. Так, в условиях 2D культивирования выявляются различия в характере роста клеток, в неоднородности монослоя: клетки различаются по размеру, форме, степени пигментации и количеству ядер, а также в формировании колоний – клетки образуют как плотно упакованные эпителиоидные колонии с различной морфологией, так и “рыхлые” колонии с размытыми границами, что отражает происходящую клональную пролиферацию клеток (Kuznetsova et al., 2011). В условиях 3D культивирования (в коллагеновом геле, на бесклеточном каркасе сетчатки) гетерогенность клеток РПЭ проявляется в разделении на две схожие по морфологии и однотипные по поведению субпопуляции клеток: одна субпопуляция клеток мигрирует на поверхность плотного субстрата, другая образует сфероподобные структуры из агрегированных клеток (Kuznetsova, Aleksandrova, 2017). При этом субпопуляция, сохраняющая способность к образованию плотного монослоя и редифференцировке РПЭ, может оказывать благоприятный эффект при трансплантации, тогда как вторая субпопуляция, образующая клеточные агрегаты, может оказывать тракционное действие на окружающие ткани, что неблагоприятно при трансплантации. Такие особенности гетерогенности клеток РПЭ следует учитывать при его использовании в тканевой инженерии.

Наряду с этим, из патоморфологических исследований хорошо известно, что в глазах человека иногда обнаруживаются хрящевые и костные образования, которые развиваются из клеток РПЭ (Frayer, 1966; Tso, Fine, 1979; Salero et al., 2012). В условиях культуры клетки РПЭ под влиянием специфических индукторов проявляют признаки не только нейральной, но и гладкомышечной, адипо-, хондро- и остеогенной дифференцировки. По мнению ряда авторов, клетки РПЭ в определенных условиях могут становиться “мультипотентными стволовыми клетками”, способными продуцировать клетки и нейрального и мезенхимального фенотипов (Milyushina et al., 2012; Salero et al., 2012). Способность к множественным дифференцировкам подчеркивает интерес к чрезвычайно высокой пластичности клеток РПЭ и ставит задачу поиска механизмов, которые ее определяют и факторов для регуляции направленной дифференцировки.

Анализ представленных работ свидетельствует о том, что клетки РПЭ млекопитающих и человека по анатомическим, генетическим и эпигенетическим характеристикам, по особенностям происхождения, эволюционному наследству, по способностям к дедифференцировке, пролиферации

и пластичности представляют огромный интерес в качестве источника новых фоторецепторов и других нейронов в деградирующей сетчатке. Однако кратковременный характер проявления клетками РПЭ взрослого человека *in vitro* пронеуральных свойств инициировал исследования по поиску возможностей прямого репрограммирования РПЭ с использованием генетических, эпигенетических и химических методов воздействия, речь о которых и пойдет ниже.

### ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Генетические программы являются основными движущими силами развития сетчатки, которые координируют пролиферацию и выход клеток из клеточного цикла, определяют клеточные судьбы, контролируют количество клеток и управляют клеточным созреванием (Reese, Keeley, 2016). В основе дифференцировки или репрограммирования любых клеток лежат процессы распознавания и активации молчащих генов. Эти процессы происходят в результате совместного действия так называемых первичных, пионерских или пионер-фактор транскрипции с каноническими транскрипционными факторами (Kuzmich et al., 2015; Mayran et al., 2019). При репрограммировании клеток обычно используется комбинация транскрипционных факторов, часть из которых являются пионер-факторами. Так, при получении функциональных глутаминергических нейронов из фибробластов мыши при помощи трех факторов транскрипции ASCL1, BRN2 и MYT1L (Vierbuchen et al., 2010), оказалось, что именно ASCL1 играет центральную роль в инициации прямого репрограммирования, поскольку его одного достаточно для индукции фибробластов в незрелые нейральные клетки, а BRN2 и MYT1L – нет. Таким образом, ASCL1 является транскрипционным пионер-фактором в нейрональном прямом репрограммировании фибробластов (Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014). При репрограммировании фибробластов в ИПСК OCT3/4, SOX2, и/или KLF4 действуют как пионер-факторы, в отличие от c-MYC (Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014; Kuzmich et al., 2015). Следовательно, для успешного генетического прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки необходимо определить пионерские факторы, без которых этот процесс не осуществим, и дополнительные, канонические факторы, которые будут продвигать клеточную конверсию после инициации процесса.

Современные методы генной инженерии, используя пути усиления или подавления функции генов, участвующих в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки, создали возможность прямого репрограммирования клеток РПЭ у мле-

копитающих. Исследователи департамента офтальмологии Университета Алабамы и медицинского факультета Бирмингема США, а так же другие группы исследователей показали, что клетки РПЭ птицы, мышей и человека можно напрямую репрограммировать воздействием различных генов, которые участвуют в процессе дифференцировки сетчатки *in vivo* и *in vitro* (Mathers et al., 1997; Yan, Wang, 1998; Toy et al., 1998b; Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001; Yan et al., 2001, 2010, 2013a, 2013b, 2015; Azuma et al., 2005; Liang et al., 2008; Ma et al., 2009a; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014; Kole et al., 2018). В табл. 1 представлены гены, необходимые для развития глаза и сетчатки, использованные в экспериментах по генетическому прямому репрограммированию клеток РПЭ и другие клетки позвоночных и человека в нейроны сетчатки. Для этого исследуемые гены при помощи вирусных векторов доставляли в клетки позвоночных и человека *in vivo* и *in vitro*. Транскрипционные факторы, участвующие в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки – это гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы, которые кодируются гомеобоксными генами (англ. homeobox). Их можно условно разделить на факторы первичной индукции – факторы глазного поля и факторы клеточной специализации и дифференцировки, относящиеся в основном к семейству с базовым структурным мотивом спираль–петля–спираль (англ. basic helix-loop-helix, bHLH) (Zagozewski et al., 2014).

**Роль транскрипционных факторов первичной индукции сетчатки в прямом репрограммировании.** Транскрипционные факторы первичной индукции клеток сетчатки PAX6, CHX10, RAX, SIX3, SIX6, OTX2, CRX, которые относятся к региональным факторам транскрипции глазного поля, необходимы для определения судьбы клеток-предшественников и для терминальной дифференцировки некоторых типов клеток сетчатки (Zagozewski et al., 2014). Влияние этих факторов на прямое репрограммирование клеток нейрального происхождения в нейроны сетчатки были изучены в ряде работ на позвоночных животных (Mathers et al., 1997; Toy et al., 1998b; Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001; Azuma et al., 2005; Yan et al., 2010; Kole et al., 2018). Так, в работе (Azuma et al., 2005) показано, что одного гена PAX6 достаточно, чтобы вызвать прямое репрограммирование клеток РПЭ куриного эмбриона (лат. *Gallus domesticus*) в нейроны сетчатки. Авторы при помощи плазмиды, несущей кДНК PAX6 человека, индуцировали прямое репрограммирование клеток РПЭ птицы *in ovo* с образованием полноценной эктопической сетчатки. Несмотря на это, другие исследователи (Yan et al., 2010), считают PAX6 “неэффективным” геном для прямого репрограммирования клеток РПЭ в нейральные клетки

сетчатки, поскольку они в своих экспериментах такового не наблюдали.

Дополнительная сетчатка или сетчаткоподобные структуры также образуются при эктопической экспрессии других факторов транскрипции глазного поля. Так, эктопическая экспрессия SIX3 или SIX6 (известный так же, как OPTX2) индуцировала гиперплазию сетчатки и образование эктопической зрительно-везикулярной или сетчаткоподобной структуры в мозге рыбы японской медаки (лат. *Oryzias latipes*), у шпорцевой лягушки (лат. *Xenopus*) и у эмбрионов мышей (лат. *Muridae*) (Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001). Авторы указывают, что SIX3/SIX6 индуцирует, но не полностью реализует более поздние стадии развития клеток сетчатки. Эктопическая экспрессия SIX6 в эмбриональных или зрелых клетках РПЭ курицы также конвертирует их к нейрональной морфологии и экспрессии маркеров, характерных для развивающихся нейронов сетчатки (Toy et al., 1998b). Эмбрионы шпорцевой лягушки, инъецированные синтетическим РНК RX, но не PAX6 и OTX2, развивают эктопическую ткань сетчатки и РПЭ (Mathers et al., 1997). Однако получить полностью структурированную сетчатку путем прямого репрограммирования РПЭ генами SIX3/SIX6 в этих экспериментах не удалось.

Одним из ключевых гомеобокс-содержащим фактором является OTX2, который регулирует начальную спецификацию фоторецепторов и РПЭ (Karali, Banfi, 2015). Так было показано, что при трансфекции OTX2 ретинальных стволовых клеток (РСК) человека происходит их дифференцировка в фоторецепторы *in vitro* (Inoue et al., 2010). Однако, Кол с коллегами показали (Kole et al., 2018), что в клетках РПЭ, полученных из ИПСК человека, эктопическая экспрессия OTX2 усиливала активности промоторов генов, которые подавляются при дедифференцировке клеток РПЭ *in vitro*, тем самым способствуя восстановлению и сохранению исходного фенотипа РПЭ, и не индуцирует процесс прямого репрограммирования этих клеток в фоторецепторы сетчатки (см. рис. 1). Эти результаты, по мнению авторов, а так же (Fisher, Ferrington, 2018), имеют определенную значимость, поскольку поддержание клеток РПЭ у пациентов с ретинопатиями, связанными с функционально дефектным РПЭ (например, возрастная макулярная дистрофия), поможет восстановлению функций фоторецепторов, поскольку РПЭ и фоторецепторы – это единая функциональная единица в сетчатке (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014).

Отрицательные результаты были получены при прямом репрограммировании других клеток глаза человека (пигментного эпителия радужки, клеток Мюллеровской глии и цилиарного тела) в фоторецепторы при вирусной трансфекции SIX3, PAX6, RX и CRX (Seko et al., 2012). Авторы показа-

Таблица 1. Гены факторов транскрипции, используемые при прямом репрограммировании соматических клеток позвоночных в клетки сетчатки

| Вид   | Исходные клетки              | Факторы транскрипции        | <i>In vivo/in vitro/in situ</i>                                       | Характеристики клеток  | I/II роль                                 | Ссылки                  |                    |
|---|------------------------------|-----------------------------|---|--|---|-------------------------|--------------------|
| Транскрипционные факторы первичной индукции клеток сетчатки |                              |                             |   |  |   |                         |                    |
| Шпорцевая лягушка<br>(лат. <i>Xenopus</i> )                 | Нервная пластинка            | <i>RX</i>                   | <i>In vivo</i>  | Эктопическая сетчатка и РПЭ  | I   | (Mathers et al., 1997)  |                    |
|   | Нервная пластинка            | <i>SIX3</i> или <i>SIX6</i> | <i>In vivo</i>  | Гиперплазия сетчатки и уменьшение РПЭ. Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры в среднем и заднем головном мозге. Нарушает развитие нормального глаза | I   | (Bernier et al., 2000b) |                    |
| Японская медака<br>(лат. <i>Oryzias latipes</i> )           | Нервная пластинка            | <i>SIX3</i>                 | <i>In vivo</i>  | Гиперплазия сетчатки. Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры в головном мозге. Иницирует, но не реализует поздние стадии развития сетчатки           | I   | (Loosli et al., 1999)   |                    |
| Мышь (лат. <i>Mus musculus</i> )                            | Клетки мозга                 | <i>SIX3</i> или <i>SIX6</i> | <i>In vivo</i>  | Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры   | I   | (Lagutin et al., 2001)  |                    |
| Курица (лат. <i>Gallus domesticus</i> )                     | РПЭ                          | <i>SIX6</i>                 | <i>In vivo</i>  | Нейрональная морфология и экспрессия маркеров  | I   | (Toy et al., 1998a)     |                    |
|   | РПЭ                          | <i>Pax6</i>                 | <i>In vivo</i>  | Полноценная эктопическая сетчатка  | I   | (Azuma et al., 2005)    |                    |
|   | РПЭ                          | <i>Pax6</i>                 | <i>In vitro</i>   |  | Неструктурированная эктопическая сетчатка | I                       | (Yan et al., 2010) |
|   |                              | <i>SIX 3</i>                |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>SIX6</i>                 |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>CRX</i>                  |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>SIX9</i>                 |   |  |   |                         |                    |
| <i>OTX2</i>   | <i>OTX2</i>                  | <i>In vitro/in situ</i>     | Восстановление фенотипа РПЭ   | II   | (Kole et al., 2018)                       |                         |                    |
| Человек<br>(лат. <i>Homo sapiens</i> )                      | Ретинальные стволовые клетки | <i>PAX6</i>                 | <i>In vitro</i>   | Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки   | II  | (Inoue et al., 2010)    |                    |
|   |                              | <i>CHX10</i>                |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>CHX10VP16</i>            |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>SIX 3</i>                |   |  |   |                         |                    |
|   |                              | <i>CRX</i>                  |   |  |   |                         |                    |
| <i>OTX2</i>   | <i>OTX2</i>                  | <i>In vitro</i>             | Стимулируют прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки | I  |   |                         |                    |

Таблица 1. Продолжение

| Вид  | Исходные клетки           | Факторы транскрипции | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>                                      | Характеристики клеток   | I/II роль           | Ссылки   |
|--|---------------------------|----------------------|--|---|---------------------|--|
| Человек<br>(лат. <i>Homo sapiens</i> )   | Цилиарное тело            | <i>SIX3</i>          | <i>In vitro</i>  | Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки  | II                  | (Seko et al., 2012)  |
|  |                           | <i>PAX6</i>          |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>CRX</i>           |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>CRX</i>           |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>RX</i>            |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>SIX3</i>          |  |   |                     |  |
|  | Клетки Мюллеровской глиии | <i>PAX6</i>          | <i>In vitro</i>  | Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки  | II                  | (Seko et al., 2012)  |
|  |                           | <i>CRX</i>           |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>CRX</i>           |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>CRX</i>           |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>RX</i>            |  |   |                     |  |
|  |                           | <i>SIX3</i>          |  |   |                     |  |
| Радужка  | <i>PAX6</i>               | <i>In vitro</i>      | Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки | II  | (Seko et al., 2012) |  |
|  | <i>CRX</i>                |                      |  |   |                     |  |
|  | <i>CRX</i>                |                      |  |   |                     |  |
|  | <i>CRX</i>                |                      |  |   |                     |  |
|  | <i>RX</i>                 |                      |  |   |                     |  |
|  | <i>SIX3</i>               |                      |  |   |                     |  |
| Транскрипционные факторы клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки |                           |                      |  |   |                     |  |
| Курица<br>(лат. <i>Gallus domesticus</i> )   | РПЭ                       | <i>NEUROD</i>        | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>                                      | Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки | I                   | (Yan, Wang, 1998; Liang et al., 2006, 2008)  |
|  |                           | <i>NGN1</i>          | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>                                      | Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные клетки, и другие нейроны сетчатки                      | I                   | (Liang et al., 2006; Li et al., 2010; Yan et al., 2010; Wang, Yan, 2014)                   |
|  |                           | <i>NGN2</i>          | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>                                      | Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки | I                   | (Yan et al., 2001; Liang et al., 2006)   |
|  |                           | <i>NGN3</i>          | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>                                      | Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки | I                   | (Liang et al., 2006; Ma et al., 2009b; Li et al., 2010; Yan et al., 2010; Wang, Yan, 2014) |

Таблица 1. Продолжение

| Вид  | Исходные клетки | Факторы транскрипции       | <i>In vivo/in vitro/in situ</i> | Характеристики клеток   | I/II роль | Ссылки   |
|--|-----------------|----------------------------|---------------------------------|---|-----------|--|
| Курица<br>(лат. <i>Gallus domesticus</i> )     | РПЭ             | <i>SOX2</i>                | <i>In vivo/in vitro</i>         | Морфологически, молекулярно и функционально пологонные клетки ганглиозного слоя и амакриновые клетки сетчатки   | I         | (Ma et al., 2009a)   |
|  |                 | <i>NSCL1</i>               | <i>In vitro</i>                 | Единичные маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки   | II        | (Ma et al., 2004)  |
|  |                 | <i>NSCL2</i>               | <i>In vivo</i>                  | Деградиация клеток Мюллеровской глии сетчатки   | II        | (Ma et al., 2009a)   |
|  |                 | <i>ASH1</i>                | <i>In vivo/in vitro</i>         | Молекулярные и морфологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки, амакриновых и горизонтальных клеток сетчатки  | I         | (Mao et al., 2008; Li et al., 2010)  |
|  |                 | <i>ATH3</i>                | <i>In vivo/in vitro</i>         | Не способствует генезу биполярных клеток сетчатки   | II        | (Yan et al., 2010)   |
| Мышь<br>(лат. <i>Mus musculus</i> )            | РПЭ             | <i>ATH5</i>                | <i>In vitro</i>                 | Маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки   | I         | (Ma et al., 2004)  |
|  |                 | <i>NGN1</i>                | <i>In vivo/in vitro</i>         | <i>In vitro</i> 30% клеток несут маркеры нейральных клеток сетчатки, 20% демонстрируют с морфологией фоторецепторных клеток. Эктопическая сетчатка                          | I         | (Yan et al., 2013a)  |
|  |                 | <i>NGN3</i>                | <i>In vitro/in situ</i>         | Эктопическая сетчатка   | I         | (Yan et al., 2013a, 2013b; Wang, Yan, 2014)  |
|  |                 | <i>ASH1</i><br><i>NGN2</i> | <i>In vitro</i>                 | Морфология и маркеры нейронов. Синаптическое созревание. Функциональная электрофизиология   | I         | (Chouchane et al., 2017)   |
|  |                 | <i>ASCL1</i>               | <i>In vivo/in vitro/in situ</i> | Морфология и молекулярные маркеры фоторецепторных, амакриновых клеток с доминированием маркеров биполярных клеток. Ответы на различные транскриптеры. Интеграция в сетчатку | I         | (Pollak et al., 2013; Ueki et al., 2015; Jorstad et al., 2017; Guimaraes et al., 2018) |
| Свинья<br>(лат. <i>Sus scrofa domesticus</i> ) | РПЭ             | <i>NGN2</i>                | <i>In vitro</i>                 | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных, амакриновых и клеток ганглиозного слоя сетчатки  | I         | (Guimaraes et al., 2018)   |
|  |                 | <i>NRL</i>                 | <i>In vivo</i>                  | Преобразование колбочек в палочки   | I         | (Montana et al., 2013)   |
|  |                 | <i>NEUROD</i>              | <i>In vitro</i>                 | Морфологические и молекулярные маркеры фоторецепторных клеток   | I         | (Yan et al., 2013a)  |

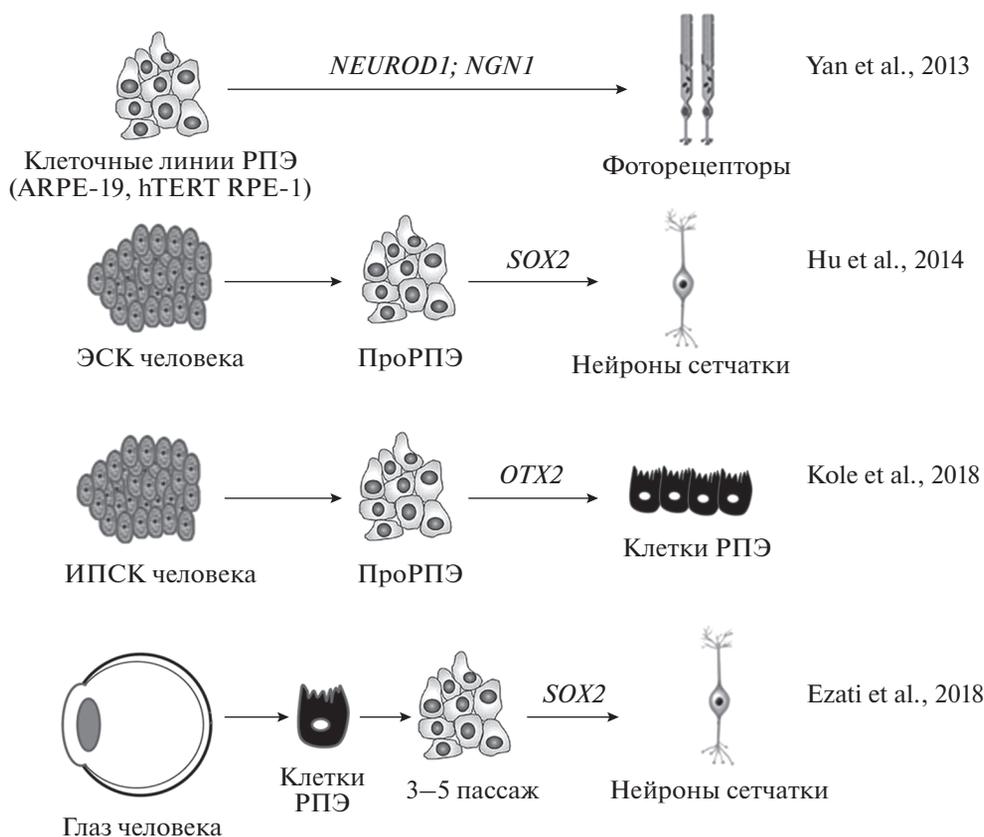
Таблица 1. Продолжение

| Вид   | Исходные клетки              | Факторы транскрипции        | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i> | Характеристики клеток   | I/II роль    | Ссылки                                |
|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|--------------|---------------------------------------|
| Человек<br>(лат. <i>Homo sapiens</i> )  | РПЭ                          | <i>SOX2</i>                 | <i>In vitro</i>                   | Повышение экспрессии нейральных и глиальных маркеров. Отсутствие ГАМК-эргических нейронов. Нет синаптических механизмов                         | I            | (Hu et al., 2014; Ezati et al., 2018) |
|   | ИТЕРТ-RPE1                   | <i>NEUROD</i>               | <i>In vitro</i>                   | 30% клеток с молекулярными и морфологическими маркерами фоторецепторных клеток сетчатки   | I            | (Yan et al., 2013a)                   |
|   |                              | <i>NGN1</i>                 |                                   |   |              |                                       |
|   | ARPE19                       | <i>NGN1</i>                 | <i>In vitro</i>                   | 10% клеток с молекулярными и морфологическими маркерами фоторецепторных клеток сетчатки   | I            | (Yan et al., 2013a)                   |
|   | Ретинальные стволовые клетки | <i>CHX10/VP16</i>           | <i>In vitro</i>                   | Индусируют прямое репрограммирование фоторецепторных клеток сетчатки  | I            | (Inoue et al., 2010)                  |
|   |                              | <i>OTX2</i>                 |                                   |   |              |                                       |
|   |                              | <i>CRX</i>                  |                                   |   |              |                                       |
|   | Цилиарное тело               | <i>NEUROD</i><br><i>NRL</i> | <i>In vitro</i>                   | Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки   | II           | (Seko et al., 2012)                   |
|   | Клетки Мюллеровской глиии    | <i>NEUROD</i><br><i>NRL</i> | <i>In vitro</i>                   | Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки   | II           | (Seko et al., 2012)                   |
|   | РаДУЖКА                      | <i>NEUROD</i><br><i>NRL</i> | <i>In vitro</i>                   | Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки   | II           | (Seko et al., 2012)                   |
| <i>Комбинации различных генов транскрипционных факторов и других факторов</i> |                              |                             |                                   |   |              |                                       |
| Курица<br>(лат. <i>Gallus domesticus</i> )                                    | РПЭ                          | <i>ATH5</i><br><i>bFGF</i>  | <i>In vitro</i>                   | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозных клеток сетчатки  | <i>ATH5</i>  | (Ma et al., 2004)                     |
|   | РПЭ                          | <i>ASH1, ATH3, CHX10</i>    | <i>In vitro</i>                   | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры биполярных клеток сетчатки  | <i>ASCL1</i> | (Yan et al., 2010)                    |
| Мышь<br>(лат. <i>Mus musculus</i> )   | Клетки Мюллеровской глиии    | <i>ASCL1, TSA, Травма</i>   | <i>In vivo</i>                    | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры биполярных и клеток ганглиозного слоя сетчатки, с функциональной интеграцией в сетчатку | <i>ASCL1</i> | (Jorstad et al., 2017)                |
|   |                              | <i>NGN2, FGF2, EGF</i>      | <i>In vivo</i>                    | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных, амакриновых и клеток ганглиозного слоя сетчатки                        | <i>NGN2</i>  | (Guimarães et al., 2018)              |

Таблица 1. Окончание

| Вид                                 | Исходные клетки                        | Факторы транскрипции  | <i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>   | Характеристики клеток  | I/II роль   | Ссылки                           |                           |
|-------------------------------------|--|---|---|--|---|----------------------------------|---------------------------|
| Мышь<br>(лат. <i>Mus musculus</i> ) | ИПСК                                   | <i>MATH5</i><br><i>DART</i><br><i>DKK1</i><br><i>NOGGIN</i> | <i>In vitro/ in situ</i>  | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки. При трансплантации в глаз индуцированные клетки выжили, но не прижились | <i>MATH5</i>  | (Chen et al., 2010)              |                           |
|                                     |  | <i>SHX10VP16</i> ,<br><i>OTX2</i> и <i>CRX</i>              | <i>In vitro/ in situ</i>  | Функциональные фоторецепторные клетки сетчатки, способные интегрировать в ткань реципиента и устанавливать синапсы с биполярными клетками                          | <i>OTX2</i><br>и <i>CRX</i>   | (Inoue et al., 2010)             |                           |
|                                     | Цилиарное тело                         | <i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> ,<br><i>CRX</i> и <i>RX</i>       | <i>In vitro</i>   | Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов трансдукции   | <i>CRX</i> , <i>RX</i>  | (Seko et al., 2012)              |                           |
|                                     |  | <i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> ,<br><i>CRX</i> и <i>RX</i>       | <i>In vitro</i>   | Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов трансдукции   | <i>CRX</i> , <i>RX</i>  | (Seko et al., 2012)              |                           |
|                                     | Радужка                                | <i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> ,<br><i>CRX</i> и <i>RX</i>       | <i>In vitro</i>   | Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов трансдукции   | <i>CRX</i> , <i>RX</i>  | (Seko et al., 2012)              |                           |
|                                     |  | <i>CRX</i> , <i>RX</i> и<br><i>NEUROD1</i>                  | <i>In vitro</i>   | Морфологические и молекулярные маркеры нейрональных клеток. Функциональная электрофизиология   | <i>CRX</i> , <i>RX</i>  | (Seko et al., 2012)              |                           |
|                                     | Человек<br>(лат. <i>Homo sapiens</i> ) | Фибробласты   | <i>ASCL1</i> , <i>BRN2</i><br>( <i>POU3F2</i> ),<br><i>MYTIL</i>                                    | <i>In vitro</i>  | Индуцированные функциональные нейроны   | <i>ASCL1</i>                     | (Vierbuchen et al., 2010) |
|                                     |  |   | <i>NEUROD</i> ,<br><i>ASCL1</i> и<br><i>MYTIL</i><br>miR-9/9,<br>miR-124                            | <i>In vitro</i>  | Нейральные клетки с основными функциональными свойствами нейронов, включая образование синапсов | <i>ASCL1</i>                     | (Yoo et al., 2011)        |
|                                     |  | ИПСК  | <i>CRX</i> , <i>RAX</i> ,<br><i>NEUROD1</i><br>и <i>OTX2</i>  | <i>In vitro</i>  | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных клеток                  | <i>CRX</i> , <i>RX</i>           | (Seko et al., 2014)       |
|                                     |  |   | <i>ATOH7</i><br>( <i>MATH5</i> )<br><i>DART</i><br><i>DKK1</i><br><i>LEFTY A</i> ,<br><i>NOGGIN</i> | <i>In vitro</i>  | Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки       | <i>ATOH7</i><br>( <i>MATH5</i> ) | (Deng et al., 2016)       |

I – транскрипционный пионер-фактор, II – канонический транскрипционный фактор.



**Рис. 1.** Схематическое изображение генетического прямого репрограммирования клеток РПЭ человека, полученных из различных источников, в клетки сетчатки и РПЭ. РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

ли, что ни один ген из этого ряда в одиночку при его экзогенной экспрессии не индуцирует образование фоторецепторных фенотипов в исследуемых клетках *in vitro* (Seko et al., 2012). Однако, трансфекция *OTX2* и *CRX* в одиночку вызывала прямое репрограммирование РСК человека в фоторецепторы *in vitro* (Inoue et al., 2010). Такую разницу в эффективности прямого репрограммирования можно объяснить тем, что более специализированные клетки (пигментный эпителий радужки, клетки Мюллеровской глии и цилиарного тела) гораздо устойчивы к прямому репрограммированию, чем менее специализированные РСК (Pasque et al., 2011).

Интересно, что основные тканеспецифические гомеобоксные гены, находящиеся на вершине генной регуляторной сети развития глаза и/или нейральной сетчатки, показали незначительную активность в прямом репрограммировании РПЭ позвоночных в нейроны сетчатки (Yan et al., 2010). Под влиянием этих факторов не происходило формирования структурированной полноценной сетчатки. Ян с коллегами (Yan et al., 2010) отнесли эти транскрипционные факторы к “неэффективным” факторам прямого репрограммирования

клеток РПЭ в нейроны сетчатки. Эту “неэффективность” генов глазного поля в прямом репрограммировании клеток глаза, вероятно, можно объяснить общим происхождением РПЭ и сетчатки из клеток-предшественников с одинаковым паттерном экспрессии генов глазного поля. Инициация процесса их разделения происходит под эпигенетическим влиянием сигнальных молекул, синтезируемых тканями окружающими глазной пузырь, покровной эктодермой и мезенхимой, что приводит к включению узкоспециализированных генов, например, относящихся к семейству bHLH в клетках-предшественниках нейральной сетчатки и *MITF, TYR, TRP1, RPE65, CRBP, CRALBP, PITX2* в РПЭ (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014; Zagorzewski et al., 2014).

Таким образом, анализ литературы по прямому репрограммированию клеток РПЭ амфибий, птиц и млекопитающих в нейроны сетчатки с использованием эктопической экспрессии генов глазного поля показал инициацию процесса клеточной конверсии, что указывает на их роль в качестве пионерских факторов. Поскольку у человека факторы глазного поля не индуцируют прямое репрограммирование клеток РПЭ в нейроны

сетчатки, можно предположить, что они либо не требуются в качестве первооткрывателей в этом процессе, либо они относятся к пассивным первичным факторам, которые ремоделируют хроматин, делая его доступным для других транскрипционных факторов, но сами не влияют на транскрипцию генов (Kuzmich et al., 2015). Кроме того, учитывая тот факт, что некоторые гены глазного поля экспрессируются в постнатальных клетках РПЭ человека, например *PAX6*, *OTX2*, *RX*, *LHX2* (Milyushina et al., 2012; Salero et al., 2012), экзогенная экспрессия этих генов в прямом репрограммировании, возможно, не требуется, и поэтому ожидаемого результата прямого репрограммирования под действием этих генов не наблюдается (Masserdotti et al., 2016).

**Роль факторов клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки в прямом репрограммировании.** Факторы клеточной специализации и дифференцировки, это гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы, относящиеся к семейству bHLH, и к семейству Forkhead box (FOX) которые работают совместно, определяя судьбу клеток сетчатки (Zagozewski et al., 2014).

Влияние генов семейства bHLH на способность клеток РПЭ позвоночных к прямому репрограммированию в нейроны сетчатки изучено во многих работах (Yan, Wang, 1998; Yan et al., 2001, 2010, 2013a, 2013b, 2015; Liang et al., 2008; Ma et al., 2009a; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014). Результаты этих исследований показывают, что транскрипционные факторы семейства bHLH: *NEUROD*, *NGN1*, *NGN2* и *NGN3*, могут эффективно напрямую репрограммировать дифференцированные клетки РПЭ куриного эмбриона в диссоциированных культурах и эксплантатах в клетки с молекулярными, морфологическими и физиологическими свойствами молодых фоторецепторных клеток с небольшими фракциями других типов нейронов сетчатки (Yan, Wang, 1998; Yan et al., 2001, 2009, 2010; Liang et al., 2008; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014). При трансплантации в глаза развивающихся цыплят конвертированные *in vitro* клетки РПЭ продолжают развиваться в фоторецепторном направлении. Некоторые из трансплантированных клеток интегрируют в наружный ядерный слой сетчатки и встраиваются в функциональную сеть нейронов хозяина (Liang et al., 2006). В дополнение к этому показано, что клетки РПЭ курицы могут быть напрямую репрограммированы *in situ* (Li et al., 2010). В глазах куриных эмбрионов клетки РПЭ, измененные при помощи *NGN1*, *NGN2* и *NGN3*, демонстрировали молекулярные и морфологические маркеры фоторецепторных, ганглиозных и амакриновых клеток (Yan et al., 2001, 2010). У трансгенных мышей, экспрессирующих *NGN1* или *NGN3* описано возникновение эктопической сетчаткоподобной ткани, которая распо-

лагалась в сосудистой оболочке, около цилиарного тела, в зрительном нерве, а также в субретинальном пространстве (Yan et al., 2009; Wang, Yan, 2014). Интересно, что клетки дополнительного эктопического наружного ядерного слоя имели молекулярные и морфологические признаки фоторецепторов, подобно нормальным клеткам сетчатки, но их пространственная ориентация относительно слоя РПЭ была нарушена. Клетки эктопической сетчатки, расположенные во внутреннем ядерном слое, экспрессировали маркеры амакриновых и биполярных клеток, тогда как, находящиеся в слое ганглиозных клеток – маркер ганглиозных клеток (Yan et al., 2013b). Подобное прямое репрограммирование происходит в клетках РПЭ первичных культур ювенильных свиней, мышей и в клетках иммортализованных линий РПЭ человека (Yan et al., 2013a). Так с помощью вирусных конструкций, несущих гены *NEUROD* и *NGN1*, показано, что при эктопической экспрессии *NEUROD* в клеточной линии hTERT RPE-1<sup>1</sup> около 30% конвертированных клеток РПЭ демонстрируют молекулярные и морфологические маркеры молодых фоторецепторных клеток и количество их увеличивается до 50% при эктопической экспрессии *NGN1* (Yan et al., 2013a). В то же время, в клеточной линии ARPE-19<sup>2</sup> количество клеток, подвергшихся изменению в фоторецепторы, достигало лишь 10% (Yan et al., 2013a). Эту разницу в эффективности прямого репрограммирования клеточных линий РПЭ человека можно объяснить эпигенетической памятью, которая сохранилась от донорских клеток (Kim, Costello, 2017). Так линия ARPE-19 представлена наиболее эпигенетическими дифференцированными клетками (Dunn et al., 1996; Kim, Costello, 2017). Тем не менее, полученные результаты (Yan et al., 2013a) демонстрируют, что клетки РПЭ человека способны к прямому репрограммированию под влиянием эктопической экспрессии генов *NEUROD1* и *NGN1*. Однако при прямом репрограммировании клеток других тканей глаза человека (радужки, клеток Мюллеровской глии, цилиарного тела) под влиянием эктопической экспрессии *NEUROD1*, *NGN2* образование фоторецепторных клеток не наблюдалось (Seko et al., 2012). Можно предположить, что для клеток РПЭ человека транскрипционные факторы *NEUROD1* и *NGN1* могут выступать как мастер-гены или пионер-факторы. Возможно, это указывает на эпигенети-

<sup>1</sup> Клеточная линия hTERT RPE-1 получена путем трансфекции клеточной линии RPE-340 плазмидой, экспрессирующей каталитическую субъединицу теломеразы человека (Rambhatla et al., 2002). Клеточная линия RPE-340 получена от девочки 1-ого года жизни, умершей от травм (Matsunaga et al., 1999).

<sup>2</sup> ARPE-19 получена Aotaki-Keen в 1986 г от 19-летнего мужчины, умершего от травмы головы после ДТП (Dunn et al., 1996).

ческую доступность ДНК клеток РПЭ для этих факторов, которая возникла в ходе развития и сохраняется во взрослом состоянии под влиянием эндогенной экспрессии генов глазного поля, выступающих как пассивные пионерские факторы.

Другой высокопластичный тип клеток сетчатки — глиальные клетки Мюллера — также обладает внутренней способностью к прямому репрограммированию. В исследовании (Guimarães et al., 2018) показано, что клетки ганглиозного слоя сетчатки у мышей можно получить из постнатальных клеток Мюллеровской глии посредством сверхэкспрессии *NGN2*. Эктопическая экспрессия *NGN2* способствовала продукции пула нейронов с экспрессией генов фоторецепторов, амакриновых клеток и клеток ганглиозного слоя. Авторы также показали, что присутствие митогенных факторов, таких как EGF или bFGF, стимулирующих пролиферацию клеток Мюллеровской глии мыши, повышало эффективность прямого репрограммирования (Guimarães et al., 2018). Пролиферация — это один из пассивных способов снятия метилирование ДНК, эпигенетической памяти, в результате которого возрастает эффективность прямого репрограммирования (Masserdotti et al., 2016; Kim, Costello, 2017).

В работах (Pollak et al., 2013; Ueki et al., 2015) показано, что вирусная экспрессия *ASCL1*, другого представителя семейства транскрипционных факторов bHLH, достаточна для активации нейрогенной программы в клетках Мюллеровской глии млекопитающих (мышей), как в диссоциированных культурах *in vitro*, так и в интактной сетчатке *in vivo*. Эктопическая экспрессия транскрипционного фактора *ASCL1* стимулирует процесс прямого репрограммирования потомков клеток Мюллеровской глии в фоторецепторы, амакриновые и биполярные клетки после повреждения *in vivo* (Ueki et al., 2015). Это согласуется с ролью *ASCL1* в нормальном развитии, где известно, что *ASCL1* экспрессируется в поздних предшественниках, которые дают амакриновые, биполярные клетки и фоторецепторы, но не ганглиозные клетки, а делеция *ASCL1* у мышей приводит к снижению числа биполярных клеток и фоторецепторов (Brzezinski et al., 2011).

Другой представитель семейства транскрипционных факторов bHLH *ASH1* (*MASH1*) необходим в развитии для производства поздних нейронов, в том числе палочек фоторецепторов и биполярных клеток у мышей (Tomita et al., 1996). Трансгенная экспрессия *ASH1* инициирует нейрогенез сетчатки в слое РПЭ у мышей *in vivo* (Lanning et al., 2005). У курицы временная и пространственная экспрессия *ASH1* совпадает с гнезом амакриновых клеток (Jasoni et al., 1994), а сверхэкспрессия *ASH1* увеличивает популяцию этих клеток (Mao et al., 2009). В работе (Mao et al., 2008) на молекулярном, морфологическом и фи-

зиологическом уровнях показано, что *ASH1* может напрямую репрограммировать клетки РПЭ в сторону нейронов сетчатки *in vitro*, а в работе (Li et al., 2010) — *in vivo*. Однако отмечено, что в РПЭ куриных эмбрионов, инфицированных *RCAS-ASH1*, не происходит прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы (Li et al., 2010). Кроме того, эти же исследователи считают, что совместная эктопическая экспрессия *ASH1*, *ATH3* и *CHX10* способствует более эффективному генезу биполярных клеток (Yan et al., 2010), где за узкую клеточную специализированность отвечает *ASH1*.

Однако не все гены bHLH семейства, экспрессирующиеся в развивающейся сетчатке, и гомологичные пронеуральным генам дрозофилы, способны инициировать прямое репрограммирование РПЭ в нейроны сетчатки. К таким “неэффективным” генам относят *NSCL1* и *NSCL2* (Wang, Yan, 2012).

Дегенерация клеток ганглиозного слоя сетчатки является основным признаком глаукомы, поражающей людей пожилого возраста, поэтому восстановление ганглиозных клеток находится в ряду важнейших задач, как и восстановление фоторецепторов (Guimarães et al., 2018). В работе (Ma et al., 2009a) показано участие транскрипционного фактора *SOX2*, относящегося к семейству Sox, в индукции экспрессии маркеров ганглиозных и амакриновых нейронов в клетках РПЭ куриных эмбрионов *in vivo* и *in vitro* и в ингибировании экспрессии РПЭ-специфических генов. Применив подход (Ma et al., 2009a), использованный на курицах, другие исследователи (Hu et al., 2014) попытались репрограммировать клетки РПЭ, полученные из ЭСК человека (см. рис. 1). В результате они обнаружили повышенную экспрессию генов-маркеров нейрональных и глиальных клеток сетчатки и снижение экспрессии РПЭ-специфических генов. Однако в отличие от работы (Ma et al., 2009a) исследователи (Hu et al., 2014) в РПЭ человека не обнаружили экспрессию таких маркеров ганглиозных клеток, как *Islet 1/2* и протеинкиназу C, а также экспрессию *vGAT*, что указывало на отсутствие ГАМК-ергических нейронов. Кроме того, конвертированные клетки РПЭ человека не усваивали FM1-43С при стимуляции калием, что, по мнению (Hu et al., 2014), говорит об отсутствии механизма синаптической передачи. Эффект сверхэкспрессии *SOX2* в клетках РПЭ неонатального и взрослого человека *in vitro* также был оценен и в других исследованиях (Ezati et al., 2018) (см. рис. 1). Результаты показали, что *SOX2* индуцирует прямое репрограммирование клеток РПЭ человека *in vitro*, при этом наблюдается увеличение экспрессии *PAX6*, *CHX10*, *THY1* и появление родопсин-позитивных клеток, что указывает на генерацию нейрональных терминально дифференцированных клеток сетчатки (Ezati et al., 2018). *SOX2* является пионер-фактором при

прямом репрограммировании в ганглиозные клетки сетчатки для клеток РПЭ как курицы, так и человека. Но у человека происходит частичная клеточная конверсия, без образования функциональных ганглиозных клеток.

Таким образом, анализ показал, что транскрипционные факторы клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки, относящиеся к семейству bHLH и SOX, индуцируют процесс прямого репрограммирования клеток РПЭ позвоночных и человека в нейроны сетчатки. При этом тип клеток, индуцируемый прямым репрограммированием, зависит от используемого гена и от его предполагаемой роли в развитии сетчатки. Так специфичными генами для получения фоторецептороподобных клеток при прямом репрограммировании клеток РПЭ являются *NEUROD1*, *NGN1* и *NGN3* (Yan et al., 2013b; Wang, Yan, 2014), для получения биполярных клеток – *ASH1* (Li et al., 2010), а для получения ганглиозных клеток – *SOX2* (Hu et al., 2014; Ezati et al., 2018). Кроме того, исследования по прямому репрограммированию различных типов клеток показали, что индуцируемый тип клеток зависит от исходного источника клеток. Так, например, *ASCL1* или *NGN2* могут конвертировать клетки астроглии мозжечка и неокортекса в нейроны головного мозга (Chouchane et al., 2017), а клетки Мюллеровской глии – в нейроны сетчатки (Pollak et al., 2013). Эти данные свидетельствуют о важной роли типовой и региональной спецификации репрограммируемой клетки в определении идентичности индуцированных нейронов (Masserdotti et al., 2016). Кроме того, очевидно, что эффективность прямого репрограммирования сильно зависит от принадлежности клеток тому или иному виду позвоночных. Так, клетки РПЭ цыплят под влиянием сверхэкспрессии генов преобразуются в морфологически, молекулярно и физиологически полноценные специфические клетки сетчатки, тогда как у человека подобное изменение происходит лишь частично. Если для прямого репрограммирования клеток РПЭ курицы достаточно одного генетического фактора, то для РПЭ человека использование единичного фактора может быть малоэффективно. Тем не менее, факторы семейства bHLH и SOX способны индуцировать прямое репрограммирование клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки, что позволяет их использовать, как пионерские факторы при прямом репрограммировании в отличие от транскрипционных факторов глазного поля.

**Роль комбинации различных транскрипционных факторов в прямом репрограммировании.** Накопленные данные свидетельствуют о том, что не один, а конкретная комбинация нескольких транскрипционных факторов, может быть наиболее эффективным инструментом для прямого репрограммирования клеток РПЭ взрослого человека. Сочетание

транскрипционных факторов глазного поля и факторов клеточной специализации из семейства bHLH, стимулирует прямое репрограммирование различных клеток глаза человека в нейроны сетчатки (Inoue et al., 2010; Seko et al., 2012). В 2012 году Секо с коллегами (Seko et al., 2012) конвертировали при помощи вирусной трансфекции генов, отвечающих за формирование и функционирование различных фоторецепторов сетчатки: *SIX3*, *PAX6*, *CRX*, *RX*, *NRL* и *NEUROD1* клетки пигментного эпителия радужки, Мюллеровской глии и цилиарного тела человека в фоторецепторы, а также фибробласты в фоторецепторы (Seko et al., 2014). Как уже было сказано выше, экзогенная экспрессия одного гена из этого ряда в одиночку не индуцирует образование фоторецепторных фенотипов в исследуемых клетках *in vitro* (Seko et al., 2012), при этом в различных комбинациях, например, *CRX*, *RX*, и *NEUROD*, которая является “эффективной”, экзогенная экспрессия генов превращает клетки радужки человека в фоторецепторы (Seko et al., 2012). Далее, при получении фоторецепторов из РСК человека *in vitro* (Inoue et al., 2010) использовали комбинированную трансфекцию генов *OTX2* и *CRX*. Повышенную эффективность прямого репрограммирования РСК по сравнению с другими клетками глаза можно объяснить, по аналогии с нейральными стволовыми клетками, не только эпигенетическими особенностями, но и их постепенной дифференцировкой, с чередованием пролиферации и промежуточных состояний дифференцировки, которая позволяет им медленно приобретать наиболее подходящий метаболизм, необходимый для приобретения и преобразования клеточной судьбы. (Masserdotti et al., 2016).

**Перспективы генетического прямого репрограммирования.** Несмотря на ярко выраженные успехи в прямом репрограммировании клеток глаза человека, оно зачастую проходит не полноценно и, хотя клетки приобретают многие характеристики нейральных клеток сетчатки они оказываются малофункциональными (Seko et al., 2012; Yan et al., 2013a; Hu et al., 2014). В отличие от эмбрионов курицы и мышей у человека клетки РПЭ несут такие разноуровневые блокировки, что даже эктопическая экспрессия специфических генов не способна полноценно их конвертировать. Дело может быть в том, что терминально дифференцированные соматические клетки богаты эпигенетическими регуляторными механизмами, которые фиксируют специфические паттерны экспрессии генов. Существуют работы, показывающие сохранение в репрограммируемых клетках эпигенетической памяти о прежнем состоянии. Так, исследователи (Hu et al., 2010) репрограммировали РПЭ плода человека до состояния ИПСК с помощью лентивирусной экспрессии *OCT4*, *SOX2*, *LIN28* и *NANOG*. Полученные линии ИПСК демонстрировали

морфологию сходную с человеческими ЭСК, они экспрессировали маркеры стволовых клеток, и образованные из них тератомы содержали производные всех трех зародышевых листков. Однако некоторые из этих линий демонстрировали явное предпочтение к редифференцировке в РПЭ. Одним из способов сохранения эпигенетической памяти в клетках является метилирование ДНК, которое способно сохраняться в течение многочисленных клеточных циклов (Kim, Costello, 2017).

В заключение по генетическому прямому репрограммированию можно с полной уверенностью сказать, что для клеток РПЭ человека использование данного метода малоэффективно, необходимо продолжить поиск других репрограммирующих факторов и условий. Кроме того, сам метод генетической трансфекции транскрипционных факторов имеет низкий процент эффективности репрограммирования (0.01–6%). Но эту эффективность можно повысить при помощи малых молекул, некодирующих РНК, факторов роста и других соединений, которые непосредственно влияют на молекулярные каскады, вовлеченных в клеточное репрограммирование, сигнальные пути, генетическую трансфекцию, на клеточный метаболизм, на пролиферацию и клеточную гибель. Показано, что защита клеток от окислительного стресса и гибели, снижение пролиферации значительно улучшает эффективность клеточного прямого репрограммирования в нейроны (Masserdotti et al., 2016). Метод последовательного увеличения экспрессии разных генов, имитирующий процессы индукции и созревание нейронов, так же увеличивает эффективность прямого репрограммирования. Кроме того, исследователи используют комбинации генетической трансфекции с эпигенетическими агентами и факторами роста. Так, в работе (Yao et al., 2018) при прямом репрограммировании клеток Мюллеровской глии исследователи сначала стимулировали сверхэкспрессию  $\beta$ -катенина с последующей сверхэкспрессией транскрипционных факторов *OTX2*, *CRX* и *NRL*. А в исследовании (Chen et al., 2010) на ИПСК мышей *in vitro* показано, что для получения клеток ганглиозного слоя требуется сверхэкспрессия *MATH5* в комбинации с факторами роста и малыми молекулами *DKK1*, *NOGGIN* и *DAPT*. Схожие результаты получены в работе (Deng et al., 2016), в которой сверхэкспрессия *АТОН7 (MATH5)* в присутствии экзогенных молекул, участвующих в нейрогенезе сетчатки, таких как *DKK1*, *NOGGIN* и *LEFTY A*, стимулировала дифференцировку прогениторных клеток сетчатки человека, полученных из ИПСК, в клетки ганглиозного слоя сетчатки.

Из выше сказанного, можно предположить, что для полноценного прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в клетки сетчатки необходим тщательный подбор особых условий. Необходимо использовать комбинацию эпигене-

тических (в частности, деметилирующие агенты) и генетических факторов (например, трансфекцию генов *bHLH* семейства), а также коктейли из низкомолекулярных соединений, влияющие непосредственно на ремоделирование хроматина, транскрипцию генов, сигнальные пути, клеточный цикл (пролиферацию и апоптоз) и метаболизм, и дифференцировку клеток.

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКОМУ МЕТОДЫ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

**Химическое прямое репрограммирование** представляет собой прямое репрограммирование клеток при помощи малых молекул, основанное на управлении путями, которые определяют клеточную судьбу. Показано, что ингибирование малыми молекулами четырех сигнальных путей, *Notch*, *TGF- $\beta$* , *BMP*, и *GSK-3 $\beta$* , оказалось достаточным для активации нейрогенеза в гиппокампе головного мозга мыши *in vivo* (Yin et al., 2019). Типичный низкомолекулярный коктейль, используемый для конверсии клеток включает в себя следующие компоненты: эпигенетические модуляторы; молекулы, подавляющие исходные характеристики клеток; соединения, индуцирующие характеристики получаемых клеток; факторы, способствующие выживаемости и функционированию репрограммируемых клеток *in vitro* (Xie et al., 2017). Так, в работе (Zhu et al., 2010) комбинация химических соединений и одного фактора транскрипции оказалось достаточным для репрограммирования соматической клетки в ИПСК. Исследователи (Liu et al., 2013) при помощи комбинации *NGN2* с малыми молекулами, форсколином, активатором цАМФ в сигнальном пути РКА, и дорсоморфинном, ингибитором *BMP*, напрямую репрограммировали фибробласты легкого плода человека в холинергические нейроны с функциональной электрофизиологией. Позднее исследователи (Hou et al., 2013) показали, что комбинации только из семи малых молекул достаточно для химического репрограммирования соматических клеток в ИПСК. За последние несколько лет подходы с использованием низкомолекулярных молекул достигли значительных успехов в индукции плюрипотентных или функционально дифференцированных клеток из соматических клеток (Xie et al., 2017). По сравнению с другими методами, низкомолекулярные соединения имеют ряд уникальных преимуществ, таких как универсальность структуры и простота в манипулировании в зависимости от времени и концентрации. Наряду с этим, не стоит забывать о проблемах токсичности, способах доставки малых молекул и о том, что сам процесс подбора необходимых малых молекул может быть трудоемким и дорогостоящим. Тем не менее, сегодня многие исследо-

ватели считают, что развитие технологий с использованием малых молекул и CRISPR/CAS9 системы может лечь в основу успешной регенеративной терапии для восстановления тканей.

**МикроРНК прямое репрограммирование.** Известно, что микроРНК играют важную роль в пост-транскрипционной регуляции, нейральной дифференцировке, морфологическом и фенотипическом развитии (Ebert, Sharp, 2012). МикроРНК регулируют не только экспрессию генов и белков, но и действуют как эпигенетические факторы. Многие исследования показали, что микроРНК обладают свойством прямого воздействия на субъединицы комплексов ремоделирования хроматина, ассоциированных с АТФ-зависимым BRG/BRM-фактором (BAF), который является критическим при дифференцировке нейронов (Staahl et al., 2013; Abernathy et al., 2017; Lu, Yoo, 2018). При прямом репрограммировании соматических клеток в нейроны используют микроРНК в комбинациях с различными транскрипционными факторами (Yoo et al., 2011). Исследователи (Yoo et al., 2011) использовали miR-9/9\* и miR-124, микроРНК специфичные для нервных клеток, в комбинации с транскрипционным фактором *NEUROD1* для превращения фибробластов человека в нейроны. Однако полученные клетки не всегда демонстрировали повторяющийся потенциал действия, что указывает на незрелость нейронов. Для решения этой проблемы та же группа исследователей использовала два других фактора, *ASCL1* и *MYT1L*, где были получены клетки с более высокой степенью зрелости (Yoo et al., 2011). Многочисленные исследования демонстрируют, что именно комбинация микроРНК и узкоспециализированных транскрипционных факторов является наиболее эффективной для получения нейронов из других соматических клеток.

Хотя, в доступной нам литературе мы не встретили сообщений по использованию комбинации эпигенетических, генетических и низкомолекулярных соединений для прямого репрограммирования клеток РПЭ человека, достигнутые успехи по прямому репрограммированию иных соматических клеток в различные подтипы нейронов, вселяют надежду на возможность этого процесса.

## ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Последние достижения в области вычислительной биологии – это создание специфических программ для прогнозирования транскрипционных факторов, необходимых для клеточного прямого репрограммирования. Вычислительные алгоритмы CellNet, Mogrify, BART, MAGICACT и CellRouter анализируют, классифицируют и предсказывают функции транскрипционных факторов, тем са-

мым облегчая и ускоряя процесс скрининга (Morris et al., 2014; El Wazan et al., 2019). Другой подход заключается в создании компьютерной модели клетки, которая позволяет создавать симуляцию событий при использовании тех или иных факторов прямого репрограммирования, например DeepNEU (Danter, 2019). Хотя эти переломные алгоритмические модели все еще находятся в зачаточном состоянии, дальнейшее их развитие улучшит наше понимание фундаментальных свойств клеток и молекулярного взаимодействия факторов транскрипции, необходимых для прямого репрограммирования (El Wazan et al., 2019).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие исследования показывают высокий потенциал клеток РПЭ позвоночных к прямому репрограммированию в нейроны сетчатки *in vivo*. Несмотря на незначительное число работ по прямому репрограммированию клеток РПЭ человека, можно с полной уверенностью сказать, что клетки РПЭ человека способны отвечать на воздействия генной инженерии. РПЭ доступен для различных векторов, доставляющих в клетки разнообразные молекулы: гены транскрипционных факторов, химерные эндонуклеазы, систему CRISPR/Cas, рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения. Клетки отвечают на присутствие экзогенного генома ожидаемо для исследователей. Основываясь на результатах полученных по прямому репрограммированию клеток позвоночных в клетки сетчатки, на достижениях вычислительной биологии, можно предположить наиболее оптимальный набор факторов из эпигенетических, генетических и химических факторов с добавлением нейротропных факторов и факторов роста для успешной конверсии клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарность коллегам и рецензентам в помощи подготовки статьи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50135. Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН № 0108-2019-0004.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Л.А. Ржанова проводила анализ мировой литературы и написание основного текста статьи. Авторы А.В. Кузнецова участвовала в редактировании и обсуждении текста статьи, М.А. Александрова инициировала написание обзора, проводила сбор литературы и редактирование текста статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abernathy D.G., Kim W.K., McCoy M.J. et al.* MicroRNAs induce a permissive chromatin environment that enables neuronal subtype-specific reprogramming of adult human fibroblasts // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 21. № 3. P. 332–348.e9.
- Al-Hussaini H., Kam J.H., Vugler A. et al.* Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 1784–1791.
- Al-Saikhan F.I.* The gene therapy revolution in ophthalmology // *Saudi J. Ophthalmol. Off. J. Saudi Ophthalmol. Soc.* 2013. V. 27. № 2. P. 107–111.
- Anderson D.H., Stern W.H., Fisher S.K. et al.* The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1981. V. 21. № 1. Pt 1. P. 10–16.
- Artero-Castro A., Popelka S., Jendelova P. et al.* The identification of small molecules that stimulate retinal pigment epithelial cells: potential novel therapeutic options for treating retinopathies // *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. V. 14. № 2. P. 169–177.
- Azuma N., Tadokoro K., Asaka A. et al.* Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 8. P. 1059–1068.
- Bainbridge J.W.B., Smith A.J., Barker S.S. et al.* Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 21. P. 2231–2239.
- Bassett E.A., Williams T., Zacharias A.L. et al.* AP-2alpha knockout mice exhibit optic cup patterning defects and failure of optic stalk morphogenesis. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 9. P. 1791–1804.
- Bäumer N., Marquardt T., Stoykova A. et al.* Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6 // *Development*. 2003. V. 130. № 13. P. 2903–2915.
- Bernier G., Panitz F., Zhou X. et al.* Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos // *Mech. Dev.* 2000. V. 93. № 1–2. P. 59–69.
- Bharti K., Gasper M., Ou J. et al.* A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development // *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002757>
- Brzezinski J.A., Kim E.J., Johnson J.E. et al.* Ascl1 expression defines a subpopulation of lineage-restricted progenitors in the mammalian retina // *Development*. 2011. V. 138. № 16. P. 3519–3531.
- Bumsted K.M., Barnstable C.J.* Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. V. 41. № 3. P. 903–908.
- Burnight E.R., Gupta M., Wiley L.A. et al.* Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 9. P. 1999–2013.
- Chan L., Mahajan V.B., Tsang S.H.* Genome surgery and gene therapy in retinal disorders // *Yale J. Biol. Med.* 2017. V. 90. № 4. P. 523–532.
- Chen M., Chen Q., Sun X. et al.* Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 11. P. 5970.
- Chiba C., Mitashov V.* Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // Ed. Chiba C. *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human*. Research Signpost, Trivandrum, India. 2007. P. 15–33.
- Chichagova V., Hallam D., Collin J. et al.* Cellular regeneration strategies for macular degeneration: Past, present and future // *Eye*. 2018. 32(5). 946–971.
- Chouchane M., Melo de Farias A.R., Moura D.M. de S. et al.* Lineage reprogramming of astroglial cells from different origins into distinct neuronal subtypes // *Stem cell reports*. 2017. V. 9. № 1. P. 162–176.
- Danter W.R.* DeepNEU: cellular reprogramming comes of age – a machine learning platform with application to rare diseases research // *Orphanet J. Rare Dis.* 2019. V. 14. № 1. P. 13.
- Deng F., Chen M., Liu Y. et al.* Stage-specific differentiation of iPSCs toward retinal ganglion cell lineage // *Mol. Vis.* 2016. V. 22. P. 536.
- Dunn K.C., Aotaki-Keen A.E., Putkey F.R. et al.* ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties // *Exp. Eye Res.* 1996. V. 62. № 2. P. 155–170.
- Dvorianchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D.* The epigenetic basis for the impaired ability of adult murine retinal pigment epithelium cells to regenerate retinal tissue // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 3860.
- Ebert M.S., Sharp P.A.* Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes // *Cell*. 2012. V. 149. № 3. P. 515.
- El Wazan L., Urrutia-Cabrera D., Wong R.C.-B.* Using transcription factors for direct reprogramming of neurons in vitro // *World J. Stem Cells*. 2019. V. 11. № 7. P. 431–444.
- Engelhardt M., Bogdahn U., Aigner L.* Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin // *Brain Res.* 2005. V. 1040. № 1–2. P. 98–111.
- Ezati R., Etemadzadeh A., Soheili Z.-S. et al.* The influence of rAAV2-mediated SOX2 delivery into neonatal and adult human RPE cells; a comparative study // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 2. P. 1222–1235.

- Fisher C.R., Ferrington D.A. Perspective on AMD pathobiology: a bioenergetic crisis in the RPE // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018. V. 59. № 4. P. AMD41–AMD47.
- Frayer W.C. Reactivity of the retinal pigment epithelium: an experimental and histopathologic study // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1966. V. 64. P. 586.
- Fu X., Huu V.A.N., Duan Y. et al. Clinical applications of retinal gene therapies // *Precis. Clin. Med.* 2018. V. 1. № 1. P. 5–20.
- Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle // *Curr. Top Dev. Biol.* 2010. V. 93. P. 61–84.
- Fuhrmann S., Zou C., Levine E.M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis // *Exp. Eye Res.* 2014. V. 123. P. 141–150.
- Fujimura N., Taketo M.M., Mori M. et al. Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium // *Dev. Biol.* 2009. V. 334. № 1. P. 31–45.
- Grigoryan E.N., Markitantova Y.V., Avdonin P.P. et al. Study of regeneration in amphibians in age of molecular-genetic approaches and methods // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. № 1. P. 46–62.
- Guimarães R.P. de M., Landeira B.S., Coelho D.M. et al. Evidence of Müller glia conversion into retina ganglion cells using Neurogenin2 // *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 410.
- Hou P., Li Y., Zhang X. et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // *Science (80-)*. 2013. V. 341. № 6146. P. 651–654.
- Hu Q., Chen R., Teesalu T. et al. Reprogramming human retinal pigmented epithelial cells to neurons using recombinant proteins // *Stem Cells Transl. Med.* 2014. V. 3. № 12. P. 1526–1534.
- Hu Q., Friedrich A.M., Johnson L.V. et al. Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 11. P. 1981–1991.
- Inoue T., Coles B.L.K., Dorval K. et al. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 3. P. 489–500.
- Islam M.R., Nakamura K., Casco-Robles M.M. et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 6043.
- Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 24. P. 2679–2692.
- Jasoni C.L., Walker M.B., Morris M.D. et al. A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system // *Development.* 1994. V. 120. № 4. P. 769–783.
- Jiang D.J., Xu C.L., Tsang S.H. Revolution in gene medicine therapy and genome surgery // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 12.
- Karali M., Banfi S. Inherited retinal dystrophies: The role of gene expression regulators // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015. V. 61. P. 115–119.
- Kashani A.H., Lebkowski J.S., Rahhal F.M. et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 435. P. eaao4097.
- Kharitonov A.E., Surdina A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Possibilities for using pluripotent stem cells for restoring damaged eye retinal pigment epithelium // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 3. P. 30–39.
- Kim M., Costello J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory // *Exp. Mol. Med.* 2017. 49(4).
- Kole C., Klipfel L., Yang Y. et al. Otx2-genetically modified retinal pigment epithelial cells rescue photoreceptors after transplantation // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 1. P. 219–237.
- Kuzmich A.I., Tyulkina D.V., Vinogradova T.V. et al. Pioneer transcription factors in normal development and carcinogenesis // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2015. V. 41. № 6. P. 570–577.
- Kuznetsova A.V. Morphological and physiological characteristics of the native retinal pigment epithelium in vertebrate animals and human // *Biol. Bull. Rev.* 2014. <https://doi.org/10.1134/s2079086414020030>
- Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Heterogeneity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in different culturing systems // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 4. P. 569–577.
- Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A. Human adult retinal pigment epithelial cells as potential cell source for retina recovery // *Cell Tissue Biol.* 2011. V. 5. № 5. P. 495–502.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* 2014. V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/801787>
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Chentsova E.V. et al. Effect of hrWnt7a on human retinal pigment epithelial cells in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 534–540.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A. et al. Mechanisms of dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells in vitro. Morphological and molecular genetic analysis // *Cell Tissue Biol.* 2019a. V. 13. № 2. P. 107–119.
- Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // *Cell Tissue Biol.* 2019b. V. 13. № 4. P. 292–304.
- La Cour M. ACTA-EVER lecture 2007. The retinal pigment epithelium: friend or foe? // *Acta Ophthalmol.* 2008. V. 86. № 6. P. 593–597.
- Lagutin O., Zhu C.C., Furuta Y. et al. Six3 promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos // *Dev. Dyn.* 2001. V. 221. № 3. P. 342–349.
- Lanning J.L., Wallace J.S., Zhang D. et al. Altered melanocyte differentiation and retinal pigmented epithelium transdifferentiation induced by Mash1 expression in

- pigment cell precursors // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. № 4. P. 805–817.
- Léveillard T., Klipfel L.* Mechanisms underlying the visual benefit of cell transplantation for the treatment of retinal degenerations // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 3.
- Li X., Ma W., Zhuo Y. et al.* Using neurogenin to reprogram chick RPE to produce photoreceptor-like neurons // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 1. P. 516–525.
- Liang L., Yan R.-T., Li X. et al.* Reprogramming progeny cells of embryonic RPE to produce photoreceptors: development of advanced photoreceptor traits under the induction of neuroD // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. V. 49. № 9. P. 4145–4153.
- Liang L., Yan R.-T., Ma W. et al.* Exploring RPE as a source of photoreceptors: Differentiation and integration of transdifferentiating cells grafted into embryonic chick eyes // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006. V. 47. № 11. P. 5066–5074.
- Liu M.-L., Zang T., Zou Y. et al.* Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2183.
- Loosli F., Winkler S., Wittbrodt J.* Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina // *Genes Dev.* 1999. V. 13(6). № 6. P. 649–654.
- Lu Y.-L., Yoo A.S.* Mechanistic insights into microRNA-induced neuronal reprogramming of human adult fibroblasts // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 522.
- Luo M., Chen Y.* Application of stem cell-derived retinal pigmented epithelium in retinal degenerative diseases: Present and future // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 1. P. 150–159.
- Luz-Madriral A., Grajales-Esquivel E., McCorkle A. et al.* Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury // *BMC Biol.* 2014. V. 12. № 28.
- Ma W., Yan R.-T., Li X. et al.* Reprogramming retinal pigment epithelium to differentiate toward retinal neurons with Sox2 // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 6. P. 1376–1387.
- Mao W., Yan R.-T., Wang S.-Z.* Reprogramming chick RPE progeny cells to differentiate towards retinal neurons by ash1 // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 2309–2320.
- Mao W., Yan R.-T., Wang S.Z.* Proneural gene ash1 promotes amacrine cell production in the chick retina // *Dev. Neurobiol.* 2009. V. 69. № 2–3. P. 88–104.
- Martínez-Morales J.R., Dolez V., Rodrigo I. et al.* OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 24. P. 21721–21731.
- Martínez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P.* Eye development: A view from the retina pigmented epithelium // *Bio Essays.* 2014. V. 26. № 7. P. 766–777.
- Masserdotti G., Gascón S., Götz M.* Direct neuronal reprogramming: Learning from and for development // *Dev.* 2016. V. 143(14). P. 2494–2510.
- Mathers P.H., Grinberg A., Mahon K.A. et al.* The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development // *Nature.* 1997. V. 387. № 6633. P. 603–607.
- Matsunaga H., Handa J.T., Aotaki-Keen A. et al.* Beta-galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999. V. 40. № 1. P. 197–202.
- Mayran A., Sochodolsky K., Khetchoumian K. et al.* Pioneer and nonpioneer factor cooperation drives lineage specific chromatin opening // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3807.
- Milyushina L.A., Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N. et al.* Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. V. 151. № 4.
- Milyushina L.A., Poltavtseva R.A., Marei M.V. et al.* In vitro phenotypic modification of pigmented epithelium cells from human eye at early stages of development // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 148. № 1.
- Milyushina L.A., Verdiev B.I., Kuznetsova A.V. et al.* Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 153. № 1.
- Morris S.A., Cahan P., Li H. et al.* Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet // *Cell.* 2014. V. 158. № 4. P. 889–902.
- Nguyen M., Arnheiter H.* Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF // *Development.* 2000. V. 127. № 16.
- Nguyen T., Wong R.C.-B.* Neuroregeneration using in vivo cellular reprogramming // *Neural. Regen. Res.* 2017. V. 12. № 7. P. 1073–1074.
- Öner A.* Recent Advancements in gene therapy for hereditary retinal dystrophies // *Turkish J. Ophthalmol.* 2017. V. 47. № 6. P. 338.
- Öner A.* Stem Cell Treatment in retinal diseases: Recent developments // *Turkish J. Ophthalmol.* 2018. V. 48. № 1. P. 33–38.
- Otteson D.C.* Talkin' about my (re)generation: The who of intrinsic retinal stem cells // *Neuroscience.* 2017. V. 346. P. 447–449.
- Pasque V., Jullien J., Miyamoto K. et al.* Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming // *Trends Genet.* 2011. V. 27(12). P. 516–525.
- Pollak J., Wilken M.S., Ueki Y. et al.* ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors // *Development.* 2013. V. 140. № 12. P. 2619–2631.
- Rabenlehner D., Stanzel B. V., Krebs I. et al.* Reduction of iatrogenic RPE lesions in AMD patients: evidence for wound healing? // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. V. 46. № 3. P. 345–352.
- Rambhatla L., Chiu C.P., Glickman R.D. et al.* In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. № 5. P. 1622–1630.
- Reese B.E., Keeley P.W.* Genomic control of neuronal demographics in the retina // *Prog. Retin. Eye Res.* 2016. V. 55. P. 246–259.
- Remez L.A., Onishi A., Menuchin-Lasowski Y. et al.* Pax6 is essential for the generation of late-born retinal neurons and for inhibition of photoreceptor-fate during late stages of retinogenesis // *Dev. Biol.* 2017. V. 432. № 1. P. 140–150.

- Sakami S., Etter P., Reh T.A.* Activin signaling limits the competence for retinal regeneration from the pigmented epithelium // *Mech. Dev.* 2008. V. 125. № 1–2. P. 106–116.
- Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell. Stem. Cell.* 2012. V. 6; 10(1). P. 88–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.11.018>
- Satarian L., Nourinia R., Safi S. et al.* Intravitreal injection of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with advanced retinitis pigmentosa; a safety study // *J. Ophthalmic Vis. Res.* 2017. V. 12. № 1. P. 58–64.
- Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G. et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
- Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies // *Lancet.* 2015. V. 385. № 9967. P. 509–516.
- Seko Y., Azuma N., Ishii T., et al.* Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD // *Genes Cells.* 2014. V. 19. № 3. P. 198–208.
- Seko Y., Azuma N., Kaneda M. et al.* Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of CRX, RX and NEUROD // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e35611.
- Stahl B.T., Tang J., Wu W., et al.* Kinetic analysis of npBAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 25. P. 10348–10361.
- Tamiya S., Kaplan H.J.* Role of epithelial – mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Exp. Eye Res.* 2016. V. 142. № 110. P. 26–31.
- Tomita K., Nakanishi S., Guillemot F. et al.* Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina // *Genes to Cells.* 1996. V. 1. № 8. P. 765–774.
- Toy J., Yang J.M., Leppert G.S. et al.* The Optx2 homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 18. P. 10643–10648.
- Tso M.O., Fine B.S.* Repair and late degeneration of the primate foveola after injury by argon laser // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1979. V. 18. № 5. P. 447–461.
- Ueki Y., Wilken M.S., Cox K.E. et al.* Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 44. P. 13717–13722.
- Vergara M.N., Del Rio-Tsonis K.* Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system // *Mol. Vis.* 2009. V. 15. P. 1000–1013.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature.* 2010. V. 463. № 7284. P. 1035–1041.
- Wang S.-Z., Ma W., Yan R.-T. et al.* Generating retinal neurons by reprogramming retinal pigment epithelial cells // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010. V. 10. № 8. P. 1227–1239.
- Wang S.-Z., Yan R.-T.* The retinal pigment epithelium: a convenient source of new photoreceptor cells? // *J. Ophthalmic Vis. Res.* 2014. V. 9. № 1. P. 83–93.
- Wang S.-Z., Yan R.-T.* Chick retinal pigment epithelium transdifferentiation assay for proneural activities // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 884. P. 201–209.
- Xie X., Fu Y., Liu J.* Chemical reprogramming and transdifferentiation // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017. V. 46. P. 104–113.
- Yan R.-T., He L., Wang S.Z.* Pro-photoreceptor activity of chick neurogenin1 // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. V. 50(12). № 12. P. 5567–5576.
- Yan R.-T., He L., Zhan W. et al.* Induction of ectopic retina-like tissue by transgenic expression of neurogenin // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 1. P. e0116171.
- Yan R.-T., Li X., Huang J. et al.* Photoreceptor-like cells from reprogramming cultured mammalian RPE cells // *Mol. Vis.* 2013a. V. 19. P. 1178–1187.
- Yan R.-T., Li X., Wang S.-Z.* Photoreceptor-like cells in transgenic mouse eye // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013b. V. 54. № 7. P. 4766–4775.
- Yan R.-T., Liang L., Ma W. et al.* Neurogenin1 effectively reprograms cultured chick retinal pigment epithelial cells to differentiate toward photoreceptors // *J. Comp. Neurol.* 2010. V. 518. № 4. P. 526–546.
- Yan R.-T., Ma W.X., Wang S.Z.* Neurogenin2 elicits the genesis of retinal neurons from cultures of nonneural cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 26. P. 15014–15019.
- Yan R.-T., Wang S.-Z.* NeuroD induces photoreceptor cell overproduction in vivo and de novo generation in vitro // *J. Neurobiol.* 1998. V. 36. № 4. P. 485–496.
- Yao K., Qiu S., Wang Y.V., et al.* Restoration of vision after de novo genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas. // *Nature.* 2018. V. 560. № 7719. P. 484–488.
- Yin J.-C., Zhang L., Ma N.-X. et al.* Chemical conversion of human fetal astrocytes into neurons through modulation of multiple signaling pathways // *Stem cell reports.* 2019. V. 12. № 3. P. 488–501.
- Yoo A.S., Sun A.X., Li L. et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons // *Nature.* 2011. V. 476. № 7359. P. 228–231.
- Zaghloul N.A., Yan B., Moody S.A.* Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis // *Biol. Cell.* 2005. V. 97. № 5. P. 321–337.
- Zagozewski J.L., Zhang Q., Pinto V.I. et al.* The role of homeobox genes in retinal development and disease // *Dev. Biol.* 2014. V. 393. № 2. P. 195–208.
- Zhang N.L., Samadani E.E., Frank R.N.* Mitogenesis and retinal pigment epithelial cell antigen expression in the rat after krypton laser photocoagulation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993. V. 34. № 8. P. 2412–2424.
- Zhao S., Thornquist S.C., Barnstable C.J.* In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina // *Brain Res.* 1995. V. 677. № 2. P. 300–310.
- Zhu S., Li W., Zhou H. et al.* Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 7. № 6. P. 651–655.

## Reprogramming of Differentiated Mammalian and Human Retinal Pigment Epithelium: Current Achievements and Prospects

L. A. Rzhanova<sup>1,\*</sup>, A. V. Kuznetsova<sup>1</sup>, and M. A. Aleksandrova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: 9303923@gmail.com*

Impairment of the homeostatic and functional integrity of the retina and retinal pigment epithelium (RPE) is the main reason of a number of degenerative diseases of the human eye, accompanied by loss of vision. Despite the significant progress made over the past decades in the development of new methods of treatment for this pathology, a number of complications remain when using surgical methods of vision correction and so far insurmountable limitations in the use of modern approaches, such as gene therapy and genetic engineering. One of the promising approaches to the treatment of degenerative diseases of the retina may be an approach based on the use of regenerative abilities of own endogenous cells with high plasticity, in particular RPE cells and Muller glia. Currently, vertebrate RPE cells are of great interest as a source of new photoreceptors and other neurons in the degraded retina *in vivo*. In this regard, the possibilities of their direct reprogramming by genetic, epigenetic, chemical methods and their combination are investigated. The review focuses on research on gene reprogramming of vertebrate RPE cells into retinal neurons, with detailed analysis of the genes used as the main reprogramming factors, comparative analysis and extrapolation of experimental data from animals to humans. In addition, the review covers work on the use of alternative genetically-directed reprogramming approaches-chemically-mediated with the use of cocktails of therapeutic low-molecular compounds and microRNAs. In general, the results of research indicate the complexity of the process of reprogramming human RPE cells into retinal neurons. However, taking into account the results of reprogramming vertebrate cells, the availability of human RPE cells for various vectors that deliver a variety of molecules to cells: transcription factors, chimeric endonucleases, recombinant proteins and low-molecular compounds, we can assume the most optimal set of factors for the successful conversion of human RPE cells into retinal neurons.

*Keywords:* retinal pigment epithelium, RPE, retinal regeneration, gene-directed reprogramming, transcription factors, degenerative-dystrophic diseases of the eye

УДК 576.08

## ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ОРГАНОИДЫ: МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ МОЗГА

© 2020 г. К. К. Сухинич<sup>а</sup>, \*, М. А. Александрова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: [transpl@hotmail.com](mailto:transpl@hotmail.com)

Поступила в редакцию 01.03.2020 г.

После доработки 30.03.2020 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

На данный момент развитие человеческого мозга в норме и при патологии не может быть полностью воспроизведено на животных моделях, что ведет к необходимости поиска альтернативных решений. За последние годы были достигнуты значительные успехи в разработке методов культивирования церебральных органоидов мозга человека. Церебральные органоиды представляют собой 3D культуры, в которых развиваются специфичные для мозга типы клеток, полученные из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В церебральных органоидах, благодаря самоорганизации нервной ткани, воспроизводятся уникальные особенности развития человеческого мозга, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов. Однако они не являются точной копией, поэтому преодоление ряда ограничений в будущем расширит наши возможности исследовать развитие и нарушения мозга человека. Очевидно, что уже в настоящее время моделирование церебральных органоидов открывает перспективы как для фундаментальных, так и клинических исследований. В настоящем обзоре мы обсуждаем методы культивирования нервной ткани, способы получения церебральных органоидов, особенности их самоорганизации, моделирование в них процессов нормального развития и патологии мозга.

*Ключевые слова:* церебральные органоиды, 3D культуры, развитие мозга, нейрогенез, радиальная глия человека

DOI: 10.31857/S0475145020040072

### ВВЕДЕНИЕ. ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ АДЕКВАТНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗВИТИЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ 3D ОРГАНОИДОВ

Изучение развития мозга в норме и при патологии является одной из ключевых задач нейробиологии. Формирование мозга человека представляет собой особую проблему, решение которой ограничивается не только сложностью его морфо-функциональной организации, отличающейся от приматов и грызунов, но и набором допустимых методов и животных модельных систем для его исследования (Fietz, Huttner, 2011; Taverna et al., 2014; Florio et al., 2018).

Среди экспериментальных млекопитающих широко используют лабораторных грызунов, в частности мышей, на которых установлены базовые механизмы ранних этапов развития мозга. Генетические манипуляции с геномом мыши в последние годы стали очень эффективными и сложными, но во многих случаях прямой анализ человеческих тканей оказывается предпочтительнее, чем изучение модели на грызунах, поскольку, несмотря на эволюционную консервативность, развитие мозга мышей отличается от человека

(Lui et al., 2011). Так, в развивающейся коре мозга человека формируется обширная внешняя субвентрикулярная зона (вСВЗ), которая отсутствует у мышей (Hansen et al., 2010). В этой зоне расположены клетки внешней радиальной глии (вРГ), отличные от других клеток радиальной глии по поведению и экспрессии ряда специфических для человека генов (Taverna et al., 2014; Pollen et al., 2015; Florio et al., 2015, 2018). Клетки вРГ из вСВЗ генерируют огромный пул нейронов, за счет которого значительно увеличиваются размеры коры и обеспечивается ее гирификация (Sousa et al., 2017; Bershteyn et al., 2017). Они имеют характерные особенности в пролиферации (Homemet et al., 2015), а их клеточный цикл может регулироваться уникальными для приматов микроРНК, участвующими в контроле уровня пролиферации (Nowakowski et al., 2018; Prodromidou, Matsas, 2019). Кроме структурно-морфологических различий, известно, что эволюционно наиболее новая фронтальная область коры мозга человека претерпела существенные изменения, затрагивающие более 5% ее транскриптома в сравнении с близкими приматами, не говоря уже о грызунах (He et al., 2017). В дополнение к этому, в мозге человека типы астроци-

тарных клеток морфологически и функционально намного сложнее, чем у грызунов (Oberheim et al., 2009). Эти фундаментальные отличия ставят вопрос о поиске адекватных моделей для изучения механизмов раннего развития мозга человека и его заболеваний. Новые модели необходимы и для клинически направленных исследований лекарственных препаратов, потому что использование в доклинических анализах экспериментальных животных, зачастую не позволяет адекватно спрогнозировать, какие препараты и методы будут эффективны, так как около 80% новых лекарственных средств, прошедших испытания на животных, у человека терпят неудачу (Perrin, 2014; Mak et al., 2014).

Одним из подходов к решению комплексной проблемы моделирования развития мозга человека может быть применение методов культивирования клеток. На данный момент широко распространенным методом является двумерное (2D), адгезивное культивирование клеток, которое имеет преимущества в том, что культура легко масштабируется; клетки обеспечиваются равномерным доступом к факторам среды, сохраняется относительно однородная популяция клеток, что помогает проводить экспериментальные воздействия, анализировать клетки и визуализировать их в реальном времени (Koo et al., 2019). Однако такая система имеет и ряд недостатков, ограничивающих изучение развития нервной ткани (Hong, Do, 2019; Racitti et al., 2019). При 2D культивировании не достаточно реализуются специфические взаимодействия между разными типами клеток и клетками и внеклеточным матриксом, которые определяют и регулируют важные морфогенетические этапы развития *in vivo*. Например, в этой системе отсутствует пространственный градиент факторов, имеющих решающее значение для региональной спецификации мозга; нарушаются характерная клеточная полярность и миграция клеток. Но главное, что в 2D культуре не формируется трехмерная организация нервных и глиальных клеток и специфические пространственные межклеточные взаимодействия характерные для развивающегося мозга *in vivo*. Из сказанного следует, что необходимо искать пути для пространственного воспроизведения процессов развития и организации нервной ткани в условиях трехмерного микроокружения. И здесь интересным может быть создание трехмерных органоидов в системе 3D культивирования, где, как правило, клетки имеют более высокую скорость пролиферации, чем в монослойных культурах, и их дифференцировка более близка к той, что наблюдается *in situ*. Церебральные органоиды часто определяют, как органоидоподобные 3D культуры, состоящие из специфичных для мозга типов клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток (Lancaster, Knoblich, 2014; Qian et al., 2019).

Однако нужно обратить внимание, что термин “органoid” до сих пор не имеет четкого определения и его трактовка различается в зависимости от экспериментального контекста. Одни исследователи называют органоидами структуры “напоминающие органы”, возникающие при агрегации клеток, другие, – клеточные комплексы, образующиеся из коммитированных эмбриональных стволовых клеток при реализации эндогенной генетической программы (Simian, Bissell, 2017). По мнению Sasaki, органоид должен иметь: трехмерную структуру из клеток, которые устанавливают или сохраняют морфологическую идентичность моделируемого органа; разнообразие типов клеток, как в самом органе, проявляющих некоторые специализированные функции органа и, наконец, самоорганизация органоида должна соответствовать тем же внутренним организационным принципам, что и в самом органе (Sasaki, 2013).

В настоящем обзоре мы суммировали данные по методам культивирования нервной ткани, их возможности и ограничения; способы получения церебральных органоидов из стволовых клеток и особенности их самоорганизации, клеточные характеристики церебральных органоидов и моделирование в них процессов нормального развития и патологии мозга, структурные и молекулярные свойства разных нейральных органоидов *in vitro* и *in vivo*, и перспективы их использования *in vivo*.

#### КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ: ОТ 2D К 3D КУЛЬТУРАМ

История культивирования нейральных тканей насчитывает уже более 100 лет. Первая культура была получена в 1907 году Харрисоном (Harrison, 1907), который обнаружил рост нейритов нервных клеток от кусочков нервной трубки лягушек, сохраненных в капле лимфы на протяжении 4 недель. Фрагменты тканей нервной системы человека научились культивировать значительно позднее, в 40-е годы, используя хорошо зарекомендовавший себя метод висячей капли и новый метод роллерного культивирования (Hogue, 1946). Через 10 лет удалось получить первую монослойную культуру энзиматически диссоциированных клеток из спинного мозга эмбриона цыпленка (Cavanaugh, 1955). Затем Москона вырастил агрегационную культуру клеток из ткани эмбрионов мышей, где было показано, что диссоциированные клетки способны reagрегировать и образовывать тканеподобные структуры (Moscona, 1961).

Одновременно с этими исследованиями в нейробиологии произошло принципиально важное открытие, не замеченное в то время, но имевшее чрезвычайно важные последствия. В середине 60-х годов прошлого века Дж. Альтман и Г. Дас обнаружили возникновение новых нервных клеток в мозге у взрослых грызунов (Altman, Das,

1965). Несмотря на доказательство (методом автордиографии) нейрогенеза в субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа (Altman, Das, 1965; Altman, 1969), их открытие не было востребованным вплоть до 90-х годов, до момента, когда клетки нейрогенных зон поместили в культуру. Работа с культурой привела к пониманию того, что нейрогенез в мозге поддерживается за счет особых нейральных стволовых клеток (НСК), способных к самоподдержанию и дифференцировке во все основные типы клеток нервной системы (Reynolds, Weiss, 1996). Исследование показало, что клетки из СВЗ мышей (в среде без сыворотки, с добавками bFGF и EGF) образуют в культуре свободноплавающие округлые агрегаты – нейросферы. Их клетки могли, как формировать новые нейросферы, так и дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что доказывало их стволовые свойства (Reynolds, Weiss, 1996). Суммарно, способность клеток к формированию нейросфер, самоподдержанию и дифференцировке была положена в определение термина – нейральная стволовая клетка.

Первые мультипотентные НСК человека были получены из мозга эмбриона 10.5 недель развития в 1999 году (Vescovi et al., 1999). Способные к самообновлению и длительному сохранению в культуре НСК дали возможность исследовать определенные этапы развития мозга и моделировать некоторые заболевания *in vitro* (Carpenter et al., 1999). Здесь интересно вспомнить о наших работах проведенных ранее. Анализируя морфологию и клеточный состав нейросфер из НСК от эмбрионов человека *in vitro* и после их трансплантации в мозг крыс, в ряде случаев мы обнаружили, что внутри сфер формировались четко организованные розетки клеток, напоминающие нейроэпителиальные структуры, о которых речь пойдет ниже (Podgorni et al., 2005; Aleksandrova et al., 2006).

Несмотря на интерес исследователей к анализу нейросфер, их редко используют для изучения ранних этапов развития мозга человека, что главным образом, связано с этическими требованиями, и особенностями их культивирования. Нейросферы трудно длительное время сохранять в культуре, они адгезируют, а их клетки хаотично мигрируют и не образуют упорядоченной структуры (Eiraku et al., 2008; Lancaster, Knoblich, 2014).

Методологические изменения произошли в конце 90-х, когда в дополнение к эмбриональным стволовым клеткам мыши (мЭСК) были получены эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК), способные генерировать клетки всех зародышевых листков (Evans, Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). Направление ЭСК по нейральному пути развития происходит при подавлении индуктивных сигналов для альтернативных

дифференцировок (Ying et al., 2003; Chambers et al., 2016) или, например, при использовании noggin для блокирования BMP4 (Itsykson et al., 2005; Gerard et al., 2005; Eiraku et al., 2008). Наряду с этим, многие авторы отмечают интересный и важный факт, что ЭСК мыши и человека в культуре могут пойти по нейральному пути развития даже в отсутствие внешних сигналов (Tropépe et al., 2001; Muñoz-Sanjuán, Brivanlou, 2002; Smukler et al., 2006). Естественно возникает вопрос, за счет каких факторов происходит нейрализация клеток? Частично ответ на него был найден при изучении ключевых для развития нервной ткани морфогенов (Vertacchi et al., 2015). Оказалось, что мЭСК нейрализуются и самостоятельно паттернируются за счет эндогенного повышения экспрессии WNT, FGF и BMP (дорзо-каудальная ось), и низкого уровня экспрессии лигандов Activin/Nodal и Shh (вентральная ось). Можно предположить, что благодаря градиенту морфогенов, нейральные клетки самоорганизуются и формируют округлые структуры из полярных нейроэпителиальных клеток, которые при адгезии на пластике образуют нейроэпителиальные розетки (Zhang et al., 2001; Gerrard et al., 2005; Elkabetz, Studer, 2008). Розетки формируются клетками с четкой апикально-базальной ориентацией, которые располагаются апикальным концом с ресничкой внутрь центральной полости, а базальным концом наружу, что в целом напоминает фронтальный срез нервной трубки с желудочком посередине. Как и при нормальном развитии, нейроэпителиальные клетки из ЭСК пролиферируют, формируют подобие вентрикулярной и субвентрикулярной зоны, где они дифференцируются в радиальную глию (РГ). Для нее характерно плотное близко друг к другу расположение клеточных тел, имеющих радиально отходящий длинный базальный отросток, растущий по мере увеличения мозга. Радиальная глия генерирует практически все нейроны и глию мозга, одновременно играя роль стволовых клеток (материнских) и рельсов, направляющих миграцию новорожденных клеток (Zhang et al., 2001; Campbell, Götz, 2002; Fietz, Huttner, 2011; Taverna et al., 2014). В органоидах митозы РГ происходят в апикальной части клетки, куда опускается ядро при делении, при этом материнская клетка сохраняет длинный отросток, а дочерняя клетка мигрирует вдоль отростка. Этот алгоритм точно повторяет нормальное развитие эмбриона (Curchoe et al., 2012; Ziller et al., 2015; Edri et al., 2015). На ЭСК были отработаны основные методические приемы получения церебральных органоидов, и многие исследования подтвердили, что *in vitro* можно создавать модели ранних этапов развития мозга человека. Однако этические споры о возможности использования эмбриональных стволовых клеток, а главное получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

(ИПСК) сместили интересы исследователей в сторону ИПСК (Takahashi et al., 2007). Хорошо известно, что данный тип клеток может быть получен как от здорового человека, так и больного пациента, что открывает путь к изучению множества заболеваний и персонализированной медицине (Avior et al., 2016). Пионерские работы (Eiraku et al., 2008; Mariani et al., 2012; Lancaster et al., 2013), в которых были получены церебральные органоиды из разных ИПСК человека в 3D культуре, выделили эти исследования в особое перспективное направление.

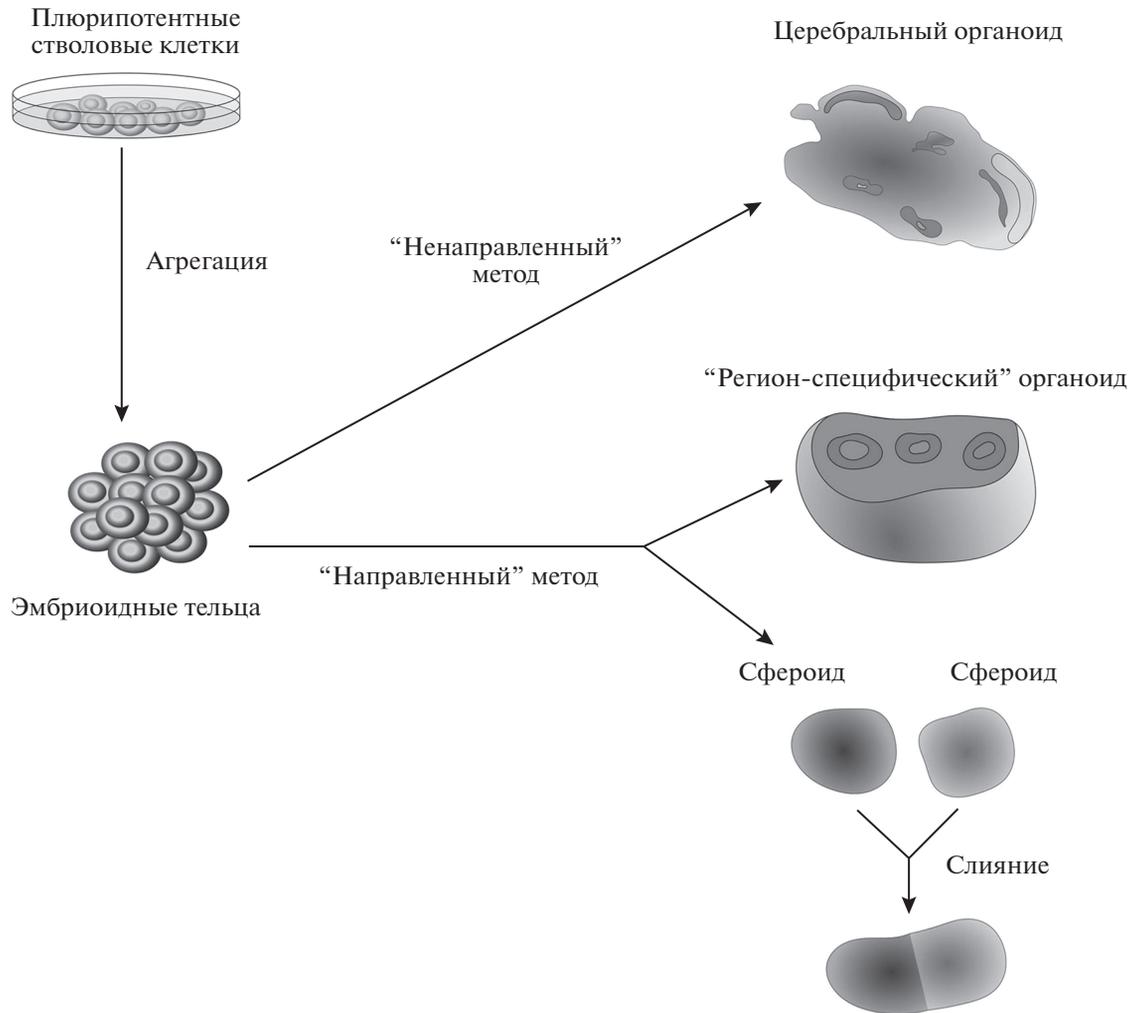
### ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ И ИХ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изначально ЭСК или ИПСК культивируют для получения эмбрионидных тел, которые представляет собой многоклеточный агрегат, имеющий ряд характеристик, аналогичных внутренней клеточной массе на стадии перед гаструляцией, с потенциалом развития клеток в три зародышевых слоя: энтодерму, эктодерму и мезодерму (Zhang et al., 2001). Затем клетки эмбрионидных тел коммитируют в нейральном направлении путем дополнения среды для культивирования специфическими факторами роста и/или ингибиторами. Благодаря самоорганизующей способности, нейральные клеточные агрегаты развиваются в органоиды, состоящие из разных нейрональных подтипов и макроглии, образующих специализированные области ЦНС (такие как кора, гиппокамп, сетчатка, спинной мозг – Eiraku et al., 2011; Mariani et al., 2012; Lancaster et al., 2013; Todd et al., 2013; Chichagova et al., 2019; Winanto et al., 2019). В органоиде химитирующих структуры переднего мозга, хорошо воспроизводятся основные особенности развивающейся коры: апикально-базальная поляриность нейроэпителлия, интеркинетическая миграция ядер в нем и РГ, способы деления РГ и характер миграции нейронов (Mariani et al., 2012). Важная особенность церебральных органоидов человека в том, что в них формируется увеличенная в СВЗ, которая является основной пролиферативной зоной у приматов, но не у мышей.

В литературе выделяют две методологии для получения органоидов мозга, которые подразделяют на “направленную” и “ненаправленную”, что с нашей точки зрения очень условно, поскольку есть множество разных протоколов для получения органоидов. “Ненаправленные” методы, главным образом, опираются на способность к спонтанному, генетически детерминированному морфогенезу и внутренней дифференцировке в агрегатах ЭСК и ИПСК (рис. 1). Минимальные добавки в композицию среды культивирования дают стволовым клеткам наибольшую свободу

для самоорганизации. “Направленные” методы, наоборот, основаны на изначальном использовании внешних регуляторных факторов, чтобы направить клетки дифференцироваться в желаемых нейральных направлениях (Qian et al., 2019; Koo et al., 2019).

В основе одного из “направленных” базовых протоколов культивирования мЭСК и чЭСК лежит метод SFEBq (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) (Watanabe et al., 2005). Клетки культивируют с использованием среды с ингибиторами SMAD, подавляя развитие мезодермы и энтодермы (Chambers et al., 2009), после чего нейральная дифференцировка продолжается автономно (Eiraku et al., 2008). Общие принципы протокола заключались в следующем. Диссоциированные мЭСК (или чЭСК) культивировали в 96 луночном низко адгезивном планшете с U-образными лунками, где через несколько часов образовывались клеточные агрегаты, подобные эмбрионидным телам, но в которых уже около 70% клеток были положительны к *bfl1* (*Foxg1*) – раннему маркеру клеток конечного мозга эмбрионов (Watanabe et al., 2005). В течение 5 сут клетки в агрегатах формировали непрерывный, поляризованный по апико-базальной оси нейроэпителлий, что подтверждалось позитивным иммуногистохимическим окрашиванием клеток на *N-cadherin+*. На 7 сут культуру переводили на среду DMEM/F12 с добавкой N2, где к 10 сут образовывалось множество круглых кластеров (дающих при адгезии розетки) из поляризованных нейроэпителлиальных клеток с базальным отростком и единственной ресничкой на апикальном конце, которые имели большое сходство с нейроэпителием и радиальной глией в нормальном эмбриональном развитии. Клетки в розетках делились симметрично и асимметрично, а митотические ядра располагались ближе к апикальной части клеток, как при интеркинетическом движении ядер в нормальном эмбриогенезе (рис. 2). Нейрогенез в мЭСК органоидах имел сходство с эмбриональным по времени рождения специфических типов клеток из радиальной глии. Последовательно появлялись клетки, несущие маркеры будущих слоев коры: *Reelin+* (слой I), *Tbr1+/Bfl1+* (слой VI), *Stip2+/Emx1+* (слой V), и *Brn2+/Tuj1+* (слой II/III), а время рождения нейронов приходилось на 8–10, 9–10, 10–11, и 12–13 сутки соответственно. Хотя, в отличие от нормы, в органоидах из мЭСК могла наблюдаться либо инверсия слоев, либо смешанное расположение клеток всех слоев, их функциональные исследования свидетельствовали об активировании специфических  $Ca^{2+}$  волн, характерных для неонатальных кортикальных тканей. Как пишут авторы, они обнаружили интригующую разницу между кортикальными тканями, происходящими от мЭСК и чЭСК. Так, при развитии коры из

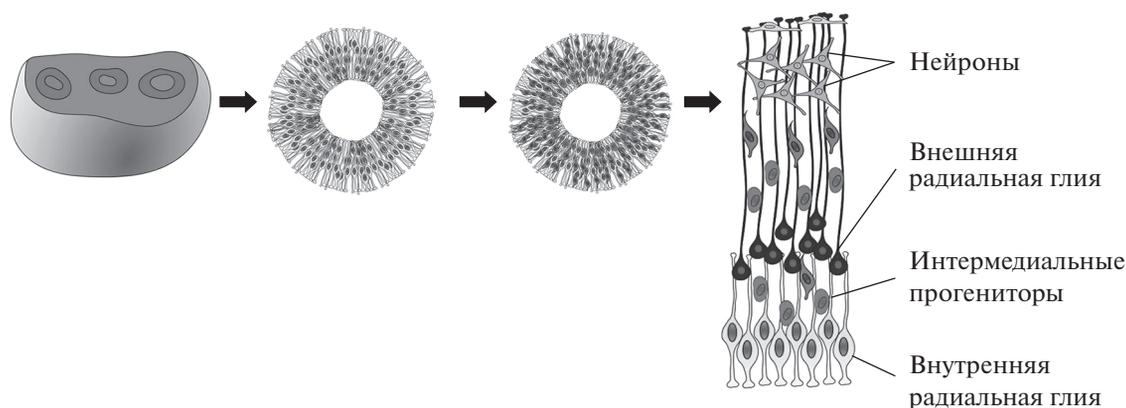


**Рис. 1.** Технологии получения церебральных органоидов. Из плюрипотентных стволовых клеток человека получают эмбрионидные тельца. Затем, в основном за счет самоорганизации идет образование церебральных органоидов (“ненаправленный метод”) либо с помощью регуляторных факторов идет формирование “регион-специфических” органоидов (“направленный метод”). Сфероиды, представляющие собой разные “регион-специфические” области мозга могут быть объединены в “ассемблоид”.

мЭСК непрерывный нейроэпителий образует несколько розеток начиная с 7-го дня культивирования, которые дезорганизовались после 12-го дня по мере уменьшения митозов нейрональных предшественников. В отличие от этого, ткани из чЭСК сохраняли непрерывную нейроэпителиальную структуру без розеток даже на 46 сут, что с нашей точки зрения совершенно очевидно, поскольку нейрогенез в переднем мозгу человека длится более 175 сут, а у мышей только 7 сут. Однако авторы связывали это с различиями в балансе дифференцировки и самообновления клеток мЭСК и чЭСК, и с возможным различием в механических свойствах клеток между видами (Eiraku et al., 2008).

Дальнейшее развитие этой технологий позволило усовершенствовать методы получения кортикальных органоидов (Kadoshima et al., 2013). В

новом протоколе в определенные моменты культивирования, авторы использовали Rho kinase ингибитор, повышенный уровень кислорода, Матригель и разные добавки к среде. В результате, растущий нейроэпителий самопроизвольно сформировал полярность дорсо-каудальной и вентро-ростральной оси, прошел специфичный морфогенез и образовал полусферическую структуру с толстой вентрикулярной зоной из Pax6+ и Sox2+ клеток, где больше делящихся клеток было в апикальной части ближе к вентрикулярной полости, как *in vivo*. За пределами вентрикулярной зоны в базальной части располагались TuJ1+ нейроны, несущие маркеры ранних нейронов кортикальной пластинки Ctip2+, Tbr1+ (Molyneaux et al., 2007; Hébert, Fishell, 2008). К 70 сут культивирования в органоиде уже можно четко различить маргинальную зону с Reelin+ клетками Кахала-Пет-



**Рис. 2.** Формирование ламинарной структуры неокортекса в церебральных органоидах, полученных из ИПСК человека. В начальный период в органоиде образуются 3D розетки, состоящие из клеток нейроэпителия. Далее структура розеток значительно усложняется из-за пролиферации и миграции клеток, появляются внутренний и внешний слой радиальной глии, интермедиальные прогениторы, а также слои, состоящие из нейронов.

циуса, нейроны глубоких слоев  $Stip2^+$ ,  $Tbr1^+$ , а между кортикальной пластинкой (КП) и СВЗ выделялась интермедиальная (промежуточная) зона с малым количеством клеток и большим числом нейритов. Непосредственно под кортикальной пластинкой располагались  $Calretinin^+$  клетки с  $MAP2^+$  отростками, которые были сходны с нейронами субпластинки. Важно, что в течение всего времени стволовые клетки сохраняли правильную апикально-базальную ориентацию, подобно радиальной глии в нормальном развитии (Campbell, Götz, 2002). К 90 сут культивирования образовывались нейроны верхних слоев с маркерами  $Satb2^+$  и  $Brn2^+$  и кортикальная пластинка становилась значительно толще. Авторы подчеркивают удивительную самоорганизацию чЭСК, отмечая, что нейроэпителий самостоятельно (без участия экзогенных морфогенов) образует три нейронные зоны (субпластинку, кортикальную пластинку и зону клеток Кахала-Ретциуса), и три прогениторные зоны (желудочковую, субвентрикулярную и промежуточную зону) в том же апикально-базальном порядке, что и в коре человека в начале второго триместра. В органоиде воспроизводится и следующий этап кортикогенеза, характерный для второго триместра, а именно появление на 91-й день (13 нед.) предшественников  $Sox2^+$   $Tbr2^+$  клеток внешней радиальной глии внешней СВЗ (которая характерна для человека, но отсутствует у мышей). Отмечается, что скорость развития кортикальных структур в органоиде в культуре примерно сравнима с таковой в мозге плода человека (Kadoshima et al., 2013).

Есть представление, что в “направленных” культурах возникают разные типы клеток в относительно постоянной пропорции с меньшей вариабельностью между партиями органоидов и исходными клеточными линиями. В тоже время, “направленные” органоиды обычно содержат от-

носительно небольшие нейроэпителиальные комплексы, и их цитоархитектура зачастую не является четко определенной, что может быть следствием неадекватных условий культивирования.

“Ненаправленный” метод получения нейральных органоидов из ИПСК человека, который использовала М. Ланкастер, включает модификацию среды, использование матригеля и биореактора для поддержания самоорганизации клеток (Lancaster et al., 2013; Lancaster, Knoblich, 2014). В отличие от протоколов “направленной” дифференцировки, где активировали нейроэктодерму подавляя развитие мезодермы и энтодермы ингибиторами SMAD (Chambers et al., 2009), М. Ланкастер инициировала образование церебральных органоидов в среде для эмбриональных стволовых клеток с низким уровнем основного фактора роста фибробластов (bFGF), после чего трехмерные агрегаты переводили на среду для нейральной индукции (с добавками N2 и B27). Общий принцип создания органоидов такой: сначала из ИПСК человека формируют эмбриоидные тела с нейроэктодермой, затем добавляют Матригель для формирования 3D структуры и помещают в биореактор, который обеспечивает перемешивание среды, улучшает диффузию и трофику органоидов. Далее авторы воздействовали на нейроэктодерму малыми молекулами CHIR99021 (CHIR) (GSK3 beta inhibitor) в течение 3 сут для активации сигнального пути WNT/ $\beta$ -catenin; в итоге удалось получить только структуры переднего мозга, где почти не было клеток с маркерами среднего, заднего мозга и мозжечка. Добавление в среду Матригеля создавало подобие внеклеточного матрикса и базальной мембраны, которая обеспечивала механические свойства, необходимые для апико-базальной паттернизации нейроэпителия и формирования кортикальной пластинки, более похожей на ту, которая наблюдает-

ся *in vivo* (Ranga et al., 2016). Разработанный метод позволил М. Ланкастер получить органоид, названный “мини-мозгом”, содержащий сразу ряд областей, включая разные отделы коры, гиппокамп и сетчатку. Важно, что в органоидах переднего мозга последовательно образуются структуры коры с четко выраженными слоями, которые на структурном, клеточном и молекулярном уровнях подобны вентрикулярной зоне, внешней и внутренней субвентрикулярной зоне и кортикальной пластинке *in vivo*. В последующем исследователи применили еще одно технологическое усовершенствование, которое заключалось в использовании нити (филамента) для удлинения эмбриоидных тел и нервной трубки (Lancaster et al., 2017). Авторы добавляли в культуру отдельные волокна poly (lactide-co-glycolide) copolymer (PLGA) микрометрового размера, вокруг которых формировалась ткань с большой поверхностью, сохраняя плотные межклеточные контакты и саморганизацию. В результате, в инженерных церебральных органоидах (enCOR) усиливалось развитие нейроэктодермы, улучшалось формирование коры, и в целом полученные структуры уже очень напоминали формирующийся мозг человека на стадиях 8–9 недель эмбриогенеза. Церебральные органоиды росли не менее одного–двух месяцев, и имели разные размеры, в среднем около 4 мм, а те которые достигали крупного размера ~1 см всегда в центре имели зоны некроза. Отдельные органоиды удавалось поддерживать в культуре около года, что дало возможность изучать последовательные этапы дифференцировки отдельных клеток (Lancaster, Knoblich, 2014). Важным аргументом в пользу органоидов из клеток человека была демонстрация того, что в них повторяются уникальные особенности развития мозга человека, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов (Lancaster et al., 2013, 2017; Bershteyn, Kriegstein, 2013; Pamies et al., 2014; Lancaster, Knoblich, 2014; Otani et al., 2016).

Морфологию нервных клеток в наиболее зрелых органоидах исследовали, используя метод электропорации GFP. Анализ показал, что клетки правильно ориентированы, имеют развитое дендритное древо с ведущим дендритом и общей морфологией, характерной для пирамидных кортикальных нейронов (Lancaster, Knoblich, 2014; Lancaster et al., 2017). Наряду с этим, в ряде исследований обращено внимание на то, что в органоидах формируется большое разнообразие нейронов, которое не регулярно повторяется от органоида к органоиду, что ставит вопрос о стандартизации методов культивирования (Quadrato et al., 2017). Помимо нервных клеток в органоидах развиваются астроциты (Paşca et al., 2015; Sloan et al., 2017; Qian et al., 2018), но редко встречаются олигодендроциты (Monzel et al., 2017). Это привело к отработке отдельного метода индукции клеток с ис-

пользованием PDGF-AA, IGF-1 и тиреоидного гормона, и созданию “олигокортикальных” сфероидов (Madhavan et al., 2018). На переживающих срезах с органоидов с помощью кальциевого имиджинга и микроэлектродного отведения было показано, что нейроны физиологически функциональны (Jo et al., 2016; Lancaster et al., 2017; Birey et al., 2017; Yakoub., 2019) и формируют зрелые синапсы (Sakaguchi et al., 2015). Специально для изучения синапсов в органоидах методами иммунофлуоресценции были усовершенствованы и оптимизированы методы визуализации (Yakoub, Sadek, 2018, 2019). Тот факт, что физиологическая активность возбуждающих и тормозных нейронов в кортикальных органоидах показывает их функциональность, хотя еще и менее зрелую по сравнению с взрослыми нейронами (Pasca et al., 2015; Birey et al., 2017; Qian et al., 2018; Durens et al., 2020), свидетельствует, что нейроны, образующиеся в органоидах, могут отражать развитие и созревание нейрональных функций на эмбриональных стадиях *in vivo*.

Одно из первых исследований генетических характеристик органоидов было проведено Дж. Мариани с коллегами (Mariani et al., 2012). Она, следуя протоколу (Eiraku et al., 2008) для получения органоидов переднего мозга из ИПСК, продемонстрировала согласованную активацию дорсальных теленцефальных генов в органоиде, и отсутствие молекул характерных для каудальных областей. Проведя глобальное сравнение между транскриптомами органоидов и образцами эмбрионального мозга человека на нескольких этапах развития, автор выявила поразительное соответствие в экспрессии генов между теленцефальными органоидами в 50 сут и корой головного мозга на 8–10 нед. развития. В последние годы, уже методами полногеномного бисульфитного секвенирования (scRNA-seq) церебральных органоидов и фетальных тканей коры плода мозга человека было показано, что кортикальные клетки в органоидах используют программы экспрессии генов, очень похожие на те, что реализуются при развитии в ткани мозга плода человека (Camp et al., 2015). Дополняют это данные транскриптомного анализа, которые показали, что его динамика точно моделирует траектории экспрессии генов в мозге плода человека в начальной и средней стадии развития (Luo et al., 2016). В работах подчеркивается, что в органоидах повторяются многие характерные особенности развития мозга человека, и что на этих моделях можно исследовать и изменения хроматина и генетические механизмы развития мозга человека (Kanton et al., 2019; Trevino et al., 2020). Эти результаты дополняются протеомными исследованиями, в которых методами протеомного анализа (label-free shotgun proteomics) проводили сравнение церебральных органоидов с мозгом плода человека

(Nascimento et al., 2019). Авторы выявили более трех тысяч белков, связанных со стадиями дифференцировки нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Базовые группы этих белков существенны для развития коры мозга, они участвуют в нейрогенезе, направленном росте аксонов и синаптогенезе, а белки глиальных клеток ответственны за поддержание клеток, энергетический обмен, межклеточные связи и передачу сигналов. Профиль изученных белков в органоидах в значительной степени повторял таковой при нормальном развитии мозга плода человека.

Фундаментальное значение имеют исследования церебральных органоидов человека с позиции эволюции мозга, поскольку их сравнение с органоидами других приматов может выявить молекулярные пути, лежащие в основе уникальных специализаций человеческого мозга. Пионерские работы, проведенные в этом направлении, выявили в органоидах человека более двухсот дифференциально экспрессируемых генов, обогащенных недавней дубликацией генов и включающих множественные регуляторы сигнальных путей PI3K-AKT-mTOR, что отличает их от органоидов мозга шимпанзе и коры макака (Pollen et al., 2019). Это важное направление требует выработки стратегии для определения эволюционных различий между человеком и другими приматами, в основу которой может быть положен анализ молекулярных изменений, способствовавших эволюции человеческого мозга, проявляющихся в церебральных органоидах (Giandomenico, Lancaster, 2017; Heide et al., 2018; Pollen et al., 2019; Mostajir-Radji et al., 2019; Muotri, 2019).

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

Авторы признают, что церебральные органоиды не полностью моделируют организацию мозга. В них достаточно случайным образом формируются разные клеточные комплексы, без нормального их взаимодействия, дающего взаимоподчиненные структуры в норме. В отличие от нормального развития, где из единственной нейроэпителиальной трубки развивается вся центральная нервная система, в органоидах возникает несколько нейроэпителиальных комплексов (объемных розеток), каждый из которых действует как независимый центр морфогенеза. Эти особенности морфогенеза ставят вопрос об усовершенствовании методов культивирования органоидов с целью получения более стандартизированных структур. Поэтому в многих лабораториях ведется разработка новых методов и технологических подходов, направленных на решение этих задач (Knight et al., 2018; Yakoub, Sadek, 2018; Qian et al., 2018; Ereemeev et al., 2019).

Хотя современные методы позволяют получать ткани, напоминающие различные взаимодействующие между собой области мозга, их пропорция и пространственная организация весьма неоднородны и непредсказуемы. Чтобы улучшить моделирование межрегиональных взаимодействий, несколько групп исследователей одновременно разработали оригинальный подход. Сначала из плюрипотентных стволовых клеток, по отдельности, получают органоиды определенных областей мозга, которые затем соединяют вместе (Bagley et al., 2017; Birey et al., 2017; Xiang et al., 2017). Например, при ассоциации органоидов дорсального и вентрального переднего мозга формируются “ассемблоид” с двумя отличными доменами (рис. 1) (Birey et al., 2017), между которыми возникают определенные клеточные взаимодействия. Так, рожденные в вентральном домене тормозные ГАМК-ергические интернейроны мигрировали преимущественно в направлении дорсального домена, где доминируют возбуждающие глутаматергические нейроны. Поведение клеток имитировало тангенциальную миграцию интернейронов в нормально развивающейся коре мозга *in vivo* (Anderson et al., 2001). Можно полагать, что получаемые на основе плюрипотентных стволовых клеток человека ассемблоиды могут стать моделью для изучения клеточных взаимодействий и перекрестных связей, которые существенны как для нормального развития мозга, так и при развитии его заболеваний (Marton, Paşca, 2019).

Особый интерес представляют эксперименты с формированием аксональных связей между разными типами церебральных органоидов. Первый пример *in vitro* выращенных длинных кортикальных аксонных трактов между органоидами мозга человека представлен в работе Каллена с коллегами (Cullen et al., 2019). Авторы собрали комплекс из двух органоидов, представляющих разные отделы коры, между которыми поместили специальные гидрогелевые микроколонки, предназначенные для поддержания и направления роста аксонов. В результате была сформирована достаточно “жесткая” биоинженерная конструкция с аксональными трактами длиной до 1 см, которая допускала физические манипуляции, необходимые для ее трансплантации в мозг. Авторы обращают внимание на то, что работа представляет собой первый шаг к возможности реконструкции мозга с помощью специфичной для пациента, выращенной *in vitro* кортикальной ткани с длинными аксонными трактами (Cullen et al., 2019).

## РОЛЬ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ В ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Органоиды головного мозга, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов, используются для моделирования расстройств головного мозга, связанных с развитием нервной системы (Chen et al., 2019; Qian et al., 2019), для проверки эффектов лекарственных средств (Aasen, Vergara, 2020) и токсинов на нервные клетки (Chhibberet et al., 2020). Прогресс, достигнутый в формировании органоидов мозга, имеет исключительную важность для изучения природы распространенных нарушений развития мозга человека. Механизмы развития патологий часто ищут в изменении регуляции клеток-предшественников, включая их преждевременную дифференцировку, сниженную пролиферацию или нарушение клеточного цикла, что можно, в определенных пределах, исследовать на церебральных органоидах.

Одно из первых нарушений развития мозга человека, исследованных на церебральных органоидах была микроцефалия — патология, при которой заметно уменьшается размер мозга (Lancaster et al., 2013). Микроцефалия связана с аутосомно-рецессивными мутациями в нескольких генах, каждый из которых кодирует белки, локализуемые в аппарате митотического веретена (Megraw et al., 2011). До недавнего времени патогенез микроцефалии исследовался на мышинной модели, где так и не удалось воспроизвести сильно уменьшенный размер мозга. В противоположность этому, микроцефальные органоиды человека имели выраженное уменьшение размеров в сравнении с контрольными образцами. В органоидах уменьшался слой нейроэпителлия и клеток радиальной глии и одновременно обнаруживалось большее число нейронов. Это свидетельствовало об их преждевременной дифференцировке нейронов, что могло объяснять изменение размера мозга (Lancaster et al., 2013). Нарушения касались и ориентации веретена деления клеток радиальной глии, что так же могло приводить к снижению числа симметричных делений и нарушению нейрогенеза. На органоидах было выявлено, что на клеточном уровне микроцефалия у человека, скорее всего, опосредуется снижением продукции прогениторных клеток и преждевременной дифференцировкой нейронов, что в сумме приводит к уменьшению размеров мозга.

Недавние клинические исследования обнаружили, что вызвать микроцефалию может вирус Зика, который во время беременности может проходить через плаценту и получить доступ к развивающемуся мозгу плода (Driggers et al., 2016; Mlakar et al., 2016). Поэтому органоиды были использованы как модель разных стадий развития

плода для изучения эффектов воздействия вируса Зика. После того как в культуру добавляли вирус Зика на сутки, было обнаружено, что церебральные органоиды развивались значительно меньшего размера. В них происходило уменьшение толщины и размера ростовой вентрикулярной зоны из-за клеточной гибели и подавления пролиферации. Выяснилось, что вирус Зика локализовался в незрелых нейронах и астроцитах, однако специфический тропизм вирус проявлял к НСК, включая клетки ВРГ, что, вероятно, и являлось причиной патологии развития мозга (Qian et al., 2016, 2017, 2019).

Церебральные органоиды были использованы для изучения механизмов проявления синдрома Дауна, при котором одной из причин когнитивных нарушений является дисбаланс возбуждающей и тормозной активности кортикальных нейронов. Как известно, много тормозных ГАМК-ергических интернейронов возникает и мигрирует в развивающуюся кору из нейроэпителлия вентральной части переднего мозга (Anderson et al., 2001), где у человека экспрессируются транскрипционные факторы OLIG1 и OLIG2 (Barber, Pierani, 2016). Авторы обнаружили, что в органоидах, полученных из клеток пациентов с синдромом Дауна, присутствует избыточное количество OLIG2+ клеток. Эти клетки генерируют увеличенное число определенных типов ГАМК-ергических интернейронов, из-за чего в коре может нарушаться баланс возбуждающих и тормозных нейронов и приводить к эпилептиформной активности (Xu et al., 2019). На органоидах, полученных от пациентов с синдромом Ангельмана, удалось показать, что в основе эпилептической нестабильности у больных лежит дисфункция калиевого канала, которую вызывают нарушения в гене убиквитин-белковой лигазы E3A (UBE3A) (Sun et al., 2019). В дополнение, органоиды использовали для моделирования гемического повреждения коры головного мозга, которое развивается вследствие человеческой церебральной малярии, и для тестирования лекарств, снижающих повреждение головного мозга и неврологические осложнения при малярии (Harbuzariu et al., 2019).

Нужно отдавать себе отчет в том, что большинство нейродегенеративных заболеваний проявляются у взрослых и пожилых людей, вследствие чего органоиды, имитирующие эмбриональное развитие мозга, могут не подходить для моделирования их патогенеза. Тем не менее, в настоящее время в изучении патогенеза многих нейродегенеративных процессов получили важную роль исследования, связанные именно с развитием нервной системы, поэтому органоиды могут быть полезны и для патологий, проявляющихся с возрастом (Faravelli et al., 2020). Удивительным образом, но уже в органоидах, созданных на основе клеток пациентов с болезнью Альцгеймера, проявляются

такие характерные возрастные патологические признаки, как накопление амилоидных бляшек и нейрофибрилярных клубков, что позволяет их использовать как модельные системы (Raja et al., 2016; Seo et al., 2017; Gonzalez et al., 2018). На органоидах можно частично моделировать даже болезнь Паркинсона. Известно, что допаминовые нейроны, дифференцированные из человеческих плюрипотентных стволовых клеток в адгезивных условиях *in vitro*, не повторяют некоторых особенностей нейронов среднего мозга *in vivo*. Например, они не продуцируют пигмент нейромеланин, если только “старение” не вызвано искусственно, посредством экспрессии ассоциированного с заболеванием прогерина (Miller et al., 2013). Исходя из этого, был разработан протокол получения органоидов среднего мозга, в которых развивались клетки экспрессирующие нейромеланин, структурно сходный с выделенным из черной субстанции мозга человека (Jo et al., 2016). Показано также, что органоиды среднего мозга, в которых развиваются TH-позитивные допаминергические нейроны, при фармакологической индукции нейродегенерации могут служить подходящей моделью болезни Паркинсона (Qian et al., 2016; Jo et al., 2016; Monzel et al., 2017). Считается, что исследование органоидов, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона, может дать уникальную возможность непосредственно исследовать патогенные механизмы и тестировать лекарственные соединения в нейронах человека (Marotta et al., 2020).

С целью изучения развития нервно-мышечных патологий, например, миастении были разработаны методы получения нервно-мышечных органоидов в которых развиваются функциональные нервно-мышечные соединения в комплексе с Шванновскими клетками. Использование таких органоидов даст возможность моделировать нервно-мышечных заболевания в будущем (Faustino Martins et al., 2020).

Церебральные органоиды человека могут представлять интересную модельную систему для изучения широкого спектра лекарственных препаратов. На них были изучены эффекты галлюциногенной молекулы 5-метокси-N,N-диметилтриптамина (5-MeO-DMT) на белковый состав 45 сут церебральных органоидов человека (Dakic et al., 2017). После воздействия 5-MeO-DMT в течение 24 ч, из 6728 идентифицированных белков 934 экспрессировались отличным от контроля образом. В опытных органоидах снижалась регуляция сигнальных путей NFAT и NF-κB, что свидетельствовало о противовоспалительных эффектах, и наблюдалась модификация белков связанных с организацией микротрубочек и цитоскелета, участвующего в формировании дендритных шипиков. О защитной функции препарата свидетельствовало снижение белков клеточной гибели и путей нейродегенерации. Интересно, что этот лекарственно-зависи-

мый паттерн экспрессии белка наблюдался только в 3D органоидной модели мозга, но не в двумерных клеточных культурах нейронов (Dakic et al., 2017). В другой работе церебральные органоиды человека использовали для изучения пренатального влияния метамфетамина на развитие мозга плода. Исследование с использованием одноклеточного РНК-секвенирования (scRNA-seq) показало изменения транскрипции в астроцитах и нейронных предшественниках. Авторы обнаружили повышенную регуляцию генов раннего ответа, факторов комплемента, апоптоза и генов иммунного ответа, что указывало на активацию нейровоспалительного ответа регулирующего пролиферацию, дифференцировку и гибель нервных стволовых клеток. Метамфетамин-индуцированные изменения в экспрессии нейровоспалительных и цитокиновых генов, показанные на уровне РНК и белка, свидетельствовали, что органоиды человека представляют собой модельную систему для изучения лекарственно-индуцированного воспаления в ЦНС (Dang et al., 2020).

Органоиды можно применять и в другой сфере, исследовать на них нейротоксичность, например, моделировать воздействие тяжелых металлов на плод (Chhibber et al., 2020). Кроме того, органоиды используют и для получения и изучения опухолей, без трансплантации опухолевых клеток лабораторным животным (Chenet al., 2019).

#### ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ОРГАНОИДОВ, ПРОБЛЕМА ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ, И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ *IN VIVO*

Определенно, что церебральные органоиды, имитирующие ряд аспектов нейрогенеза мозга человека, подобно всем другим модельным системам, имеют ряд ограничений. Одна из проблем связана с тем, что в церебральных органоидах практически отсутствуют мезенхимные клетки, в частности микроглия и эндотелиоциты, которые необходимы для нормального развития и функционирования нервной ткани. Клетки микроглии, происходящие от эритромиелодных предшественников желточного мешка, в раннем эмбриогенезе заселяют мозг и, являясь медиатором воспаления, выполняют иммунную функцию при повреждении и нейродегенерации. О значении васкуляризации нет смысла говорить, поскольку очевидно, что без развития сосудистой системы жизнеспособность церебральных органоидов резко ограничена. К решению этой “тканевой” проблемы подошли следующим образом, использовали раздельное культивирование клеток микроглии или эндотелиальных клеток, после чего их соединяли с мозговыми органоидами. Интересен пример сокультивирования изогенных микроглиоподобных клеток с органоидами дорсального переднего

мозга. В результате миграции микроглии внутрь органоидов в них усиливалась иммунная функция, активировалась передача сигналов mTOR и p53, повышалась экспрессия лигандов Notch, активировалась репрессия NF-κB и канонических путей Wnt (Bejoy et al., 2019). Кроме сокультивирования, путем манипулирования разными добавками к среде культивирования (bFGF, ROCK-inhibitor Y-27632, neural induction medium) оказалось возможным получить церебральные органоиды с микроглияльными клетками, которые развивались из мезенхимных закладок одновременно с нейральными клетками (Ormel et al., 2018). Авторы отмечают, что иммунологическая микросреда, приближенная к нормальной за счет ассоциации микроглии в кортикальные органоиды *in vitro*, позволит намного лучше воспроизводить функцию мозговой ткани *in vivo*, что необходимо для адекватного моделирования заболеваний и скрининга лекарств (Ormel et al., 2018; Bejoy et al., 2019).

Подобным образом эндотелиальные клетки можно культивировать отдельно и добавлять к органоидам на стадии формирования эмбриоидных тел, что дает возможность эндотелиоцитам самоорганизоваться с образованием сетчатых структур (Nzou et al., 2018; Pham et al., 2018). Кроме того, рост сосудов можно индуцировать добавкой в эмбриоидные тела фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который активирует дифференцировку эндотелиальных клеток, не блокируя нейрональную дифференцировку. В результате успешно развиваются церебральные органоиды с сосудистыми структурами, клетки которых экспрессируют маркер эндотелия CD31 и маркер плотных контактов клаудин-5, характеризующий гематоэнцефалический барьер (Nam et al., 2020). Хотя примитивные эндотелиальные сети оказались неспособными нормально функционировать и обеспечивать доставку питательных веществ в органоиды, сами эти исследования дают потенциальную платформу для моделирования нейроваскулярной ниши и гематоэнцефалического барьера (Nzou et al., 2018; Pham et al., 2018; Nam et al., 2020).

Очевидно, что в органоиде по мере генерации большого числа нейронов кортикальная пластинка утолщается и отсутствие васкуляризации ухудшает выживаемость клеток, ограничивается размер органоида и нарушает общую структуру ткани (Shen et al., 2004; Yin et al., 2016). Для васкуляризации органоида была предпринята имплантация в живой мозг с целью провоцирования их васкуляризации для долгосрочного выживания (Mansour et al., 2018). Трансплантированные в полость, сделанную в коре головного мозга иммунодефицитных мышей, GFP чЭСК органоиды интегрировались, и 80% из них переживало не менее 120 сут. Их отличительной морфологической чертой бы-

ло формирование четко выраженных нейроэпителиальных слоев и желудочковых зон. Кровеносные сосуды хозяина проникали на 7–10 день, и органоиды становились сильно васкуляризованными на 14 день. С помощью двухфотонной микроскопии авторы показали, что через сосуды идет активный кровоток, и ткани органоида снабжаются кровью. Отдельные трансплантаты, выжившие до 233 сут (последний срок, протестированный в исследовании), показали постоянную экспрессию в нейронах NeuN и SOX2. Число меченых hGFAP астроцитов, которых до трансплантации в органоидах было минимально, после интеграции значительно возросло со временем. Кроме того, на средних и поздних сроках, в трансплантированных органоидах были выявлены олигодендроциты Olig2+, однако миелинизации не было обнаружено. О формировании синаптических контактов в трансплантированном органоиде свидетельствовала колокализация пресинаптического маркера Synapsin I и постсинаптического PSD95. Микроглия Iba1 мигрировала из ткани мозга хозяина в органоид. На 90 сутки обнаруживался обширный рост аксонов GFP+ человека из органоида, и волокна распространялись в обоих полушариях мозга мыши, хотя в ипсилатеральном их было значительно больше. Кроме того, обнаруживались синапсы между нейронами человека и мыши. Функциональную активность нейронов трансплантатов подтвердили, используя кальцевый имиджинг, методы оптогенетики и электрофизиологии.

В другом исследовании церебральные органоиды из ИПСК человека сокультивировали с эндотелиальными клетками, выращенными от того же донора (Harding et al., 2017; Pham et al., 2018). Затем “васкуляризованные” органоиды трансплантировали в полость в коре мозга иммунодефицитных мышей. Через две недели в некоторых органоидах наблюдалась сильная васкуляризация вплоть до центра, а не васкуляризованные органоиды не переживали. После трансплантации человеческие CD31-позитивные кровеносные сосуды сохранялись внутри и в центре органоида, что свидетельствовало о том, что васкуляризация органоидов головного мозга с помощью ИПСК, полученных от того же пациента, технически возможна. Недостатком этого исследования является то, что авторы не доказали ни связь между капиллярами в органоидах человеческого мозга и мозгом мыши хозяина, ни перфузию человеческих капилляров кровью грызунов (Pham et al., 2018). Иную цель преследовала работа (Daviaud et al., 2018), где из чЭСК в культуре получали ИСК и церебральные органоиды, которые трансплантировали в виде суспензии, либо целиком в кору постнатальных (P8–10) мышей. Сравнивали выживаемость трансплантатов, их васкуляризацию, пул ИСК и дифференцировку через две и

четыре недели после трансплантации. Трансплантаты НСК значимо уменьшались в размерах в интервале от двух до четырех недель после пересадки, тогда как размеры церебральных органоидов оставались стабильными в течение этого периода, что подтверждало их лучшую интеграцию в сравнении с суспензированными клетками. Через 2 недели в обоих видах трансплантатов хозяйских Iba1 клеток микроглии было мало, но через 4 нед. микроглии было много вокруг трансплантата суспензии, хотя у органоида их было относительно немного. Васкуляризацию изучали по маркеру эндотелиальных клеток CD31, и обнаружили множество капилляров в органоиде, врастающих со стороны реципиента уже через две недели. В результате оказалось, что в сравнении с трансплантатом суспензированных НСК, органоиды лучше переживают и интегрируются, в них больше DCX+ и NF+ нейронов, и лучше выражены собственные астроциты и олигодендроциты (Daviaud et al., 2018).

В следующих работах церебральные органоиды уже использовали для трансплантации в мозг после инсульта (Wang et al., 2019). Авторы подсаживали органоид в мозг крыс через 6 ч или даже 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии, и показали значительное уменьшение объема инфаркта мозга и улучшение двигательной функции. Это пилотное исследование показало, что потенциально органоиды могут быть использованы для терапии при лечении инсульта.

Суммируя работы по трансплантации церебральных органоидов человека в мозг грызунов, необходимо обратить внимание на то, что основой органоидов являются малодифференцированные клетки, обладающих огромным потенциалом развития, находящиеся в архитектурно целостном комплексе. В органоидах прекрасно развит внеклеточный матрикс, являющийся источником нерастворимых и растворимых белков с нейротрофинами, факторами роста, навигации и т.д. Именно это дает органоидам преимущество перед суспензированными НСК в интеграции при трансплантации в полость мозга. Целостные органоиды из-за большого объема пересаживают в заранее приготовленную полость в мозге. Однако можно предположить, что еще лучше органоид будет развиваться в естественных полостях мозга, например, в боковых желудочках (Pothayee et al., 2018), чему будет способствовать цереброспинальная жидкость, которая служит важным компонентом ниши НСК и важна для поддержания пролиферативной активности и дифференцировки ранних клеток-предшественников (Lehtinen et al., 2011).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОГРАНИЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

Моделирование процесса формирования мозга путем построения его органоидов открывает перспективы изучения механизмов раннего эмбрионального развития в норме и при патологии, которые представляют особую проблему для человека. До настоящего времени морфология и развитие человеческого мозга не могут быть полностью воспроизведены на животных моделях, а геномные, метаболические и биохимические различия ограничивают прогностическую возможность трансляционных исследований. За последние годы были достигнуты значительные успехи в разработке методов культивирования 3D органоидов мозга человека. Несомненное преимущество органоидов, полученных из ЭСК или ИПСК человека, состоит в том, что в них воспроизводятся уникальные особенности развития человеческого мозга, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов. Способность ЭСК и ИПСК к самоорганизации в процессе нейрализации, и повторение алгоритмов, свойственных нормальному развитию, делает органоиды уникальной моделью развития мозга человека. Тем не менее, органоиды из клеток мыши, по-прежнему играют важную роль, поскольку они могут использоваться для сравнительных исследований человеческих органоидов и разработки предварительных протоколов культивирования для получения специфичных областей мозга (Marshall, Mason, 2019). Несмотря на всю привлекательность органоидных моделей, очевидно, что на данном этапе существующие ограничения препятствуют их использованию в определенных направлениях. Так, например, существует много методов получения органоидов, но не один из них не позволяет получать стабильно повторяющиеся структуры из-за спонтанной дифференцировки клеток. В органоидах развертываются ранние этапы развития мозга, в то время как более поздние стадии развития, характеризующиеся ростом нервных волокон и формированием высших функций нейронной сети, не могут быть адекватно воспроизведены в этих структурах. Кроме того, технологии получения органоидов не лишены недостатков и ограничений, например, в них не происходит дифференцировка сосудов и капиллярной сети, обеспечивающих трофическую поддержку ткани мозга, и, в ряде случаев, играющих роль скаффолда при миграции клеток. Точно так же клетки микроглии, которые происходят из эритромиелодных предшественников желточного мешка и заселяют мозг в раннем эмбриогенезе, отсутствуют в органоидах, хотя их роль как медиатора воспаления и одного из ключевых игроков при повреждении и нейродегенерации чрезвычайно важна. Кроме того, существуют некоторые этические пробле-

мы, касающиеся источников клеток, которые используются для получения органоидов, и потенциального применения этих органоидов в организме человека (Hyun et al., 2020).

Насчитывая менее чем десятилетнюю историю, технология получения и исследования органоидов мозга человека заняли важное место в нейробиологии. Несмотря на существование множества проблем, и нерешенных вопросов, можно ожидать, что исследование 3D органоидов — уникальной модели развития мозга человека приведет к более глубокому пониманию фундаментальных механизмов эмбрионального нейрогенеза, развития заболеваний и персонализированному лечению расстройств мозга.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарности коллегам за обсуждение и рекомендации при написании обзора.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00117).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор 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.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку и написание текста обзора.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aasen D.M., Vergara M.N.* New drug discovery paradigms for retinal diseases: A focus on retinal organoids // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2020. V. 36. № 1. P. 18–24.
- Aleksandrova M.A., Podgornyi O.V., Poltavtseva R.A. et al.* Structure and cell composition of spheres cultured from human fetal retina // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006. V. 142. № 1. P. 9
- Altman J., Das G.D.* Post-natal origin of microneurons in the rat brain // *Nature.* 1965. V. 207. № 5000. P. 953–956.
- Altman J.* Autoradiographic and histological studies of post-natal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats // *J. Comp. Neurol.* 1969. V. 136. № 3. P. 269–293.
- Anderson S.A., Marín O., Horn C. et al.* Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences // *Development.* 2001. V. 128. P. 353–363.
- Avior Y., Sagi I., Benvenisty N.* Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 17. № 3. P. 10–82.
- Bagley J.A., Reumann D., Bian S. et al.* Fused cerebral organoids model interactions between brain regions // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 7. P. 743–751.
- Barber M., Pierani A.* Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells // *Dev. Neurobiol.* 2016. V. 76. № 8. P. 847–881.
- Bejoy J., Yuan X, Song L. et al.* Genomics analysis of metabolic pathways of human stem cell-derived microglia-like cells and the integrated cortical spheroids // *Stem. Cells. Int.* 2019. V. 18: 2382534.
- Bershteyn M., Kriegstein A.R.* Cerebral organoids in a dish: progress and prospects // *Cell.* 2013. V. 155. № 1. P. 19–20.
- Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A. et al.* Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia // *Cell Stem. Cell.* 2017. V. 20. № 4. P. 435–449.e4.
- Bertacchi M., Pandolfini L., D'Onofrio M. et al.* The double inhibition of endogenously produced BMP and Wnt factors synergistically triggers dorsal telencephalic differentiation of mouse ES cells // *Dev. Neurobiol.* 2015. V. 75. № 1. P. 66–79.
- Birey F., Andersen J., Makinson C.D. et al.* Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids // *Nature.* 2017. V. 545. № 7652. P. 54–59.
- Camp J.G., Badsha F., Florio M. et al.* Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 51. P. 15672–15677.
- Campbell K., Götz M.* Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development // *Trends of Neuroscience.* 2002. V. 25. № 5. P. 235–238.
- Carpenter M.K., Cui X., Hu Z.Y. et al.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells // *Exp. Neurol.* 1999. V. 158. № 2. P. 265–278.
- Cavanaugh M.W.* Neuron development from trypsin-dissociated cells of differentiated spinal cord of the chick embryo // *Exp. Cell. Res.* 1955. V. 9. № 1. P. 42–48.
- Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P. et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 3. P. 275–280.
- Chambers J.M., McKee R.A., Drummond B.E. et al.* Evolving technology: creating kidney organoids from stem cells // *AIMS Bioeng.* 2016. V. 3. № 3. P. 305–318.
- Chen H.I., Song H., Ming G.L.* Applications of human brain organoids to clinical problems // *Dev. Dyn.* 2019. V. 248. № 1. P. 53–64.
- Chhibber T., Bagchi S., Lahooti B. et al.* CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening // *Drug. Discov. Today.* 2020. V. 25. № 2. P. 456–465.
- Chichagova V., Dorgau B., Felemban M. et al.* Differentiation of retinal organoids from human pluripotent stem cells // *Curr. Protoc. Stem. Cell. Biol.* 2019. V. 50. № 1:e95.

- Cullen D.K., Gordián-Vélez W.J., Struzyna L.A. et al. Bundled three-dimensional human axon tracts derived from brain organoids // *i Science*. 2019. № 21. P. 57–67.
- Curchoe C.L., Russo J., Terskikh A.V. hESC derived neuroepithelial rosettes recapitulate early mammalian neurulation events; an in vitro model // *Stem. Cell. Res.* 2012. V. 8. № 2. P. 239–246.
- Dacic V., Minardi Nascimento J., Costa Sartore R. et al. Short term changes in the proteome of human cerebral organoids induced by 5-MeO-DMT // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 12863.
- Dang J., Tiwari S.K., Agrawal K. et al. Glial cell diversity and methamphetamine-induced neuroinflammation in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry*. 2020. Feb 12. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0676-x>
- Daviaud N., Friedel R.H., Zou H. Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex // *eNeuro*. 2018. V. 5. № 6. pii: ENEURO.0219-18.2018.
- Driggers R.W., Ho C.Y., Korhonen E.M., et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 374. № 22. P. 2142–2151.
- Durens M., Nestor J., Williams M. et al. High-throughput screening of human induced pluripotent stem cell-derived brain organoids // *J. Neuro Sci. Methods*. 2020. Feb. 4:108627.
- Edri R., Yaffe Y., Ziller M.J. et al. Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors // *Nat. Commun.* 2015. Mar. 23; 6:6500.
- Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M. et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals // *Cell. Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 5. P. 519–532.
- Eiraku M., Takata N., Ishibashi H. et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture // *Nature*. 2011. V. 472. № 7341. P. 51–56.
- Elkabetz Y., Studer L. Human ESC-derived neural rosettes and neural stem cell progression // *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 2008. № 73. P. 377–387.
- Eremeev A.V., Volovikov E.A., Shuvalova L.D. et al. “Necessity is the mother of invention” or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids // *Biochemistry (Mosc)*. 2019. V. 84. № 3. P. 321–328.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Faravelli I., Costamagna G., Tamanini S. et al. Back to the origins: Human brain organoids to investigate neurodegeneration // *Brain Res.* 2020. Jan. 15; 1727:146561.
- Faustino Martins J.M., Fischer C., Urzi A. et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids // *Cell. Stem. Cell*. 2020. V. 26. № 2. P. 172–186.
- Fietz S.A., Huttner W.B. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 1. P. 23–35.
- Florio M., Albert M., Taverna E. et al. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion // *Science*. 2015. № 347. P. 470.
- Florio M., Heide M., Pinson A. et al. Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex // *Elife*. 2018. Mar. 21. 7. pii: e32332.
- Gerrard L., Rodgers L., Cui W. Differentiation human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling // *Stem Cells*. 2005. Oct.; 23(9): 1234–1241.
- Giandomenico S.L., Lancaster M.A. Probing human brain evolution and development in organoids // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2017. V. 44. P. 36–43.
- Gonzalez C., Armijo E., Bravo-Alegria J. et al. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry*. 2018. V. 23. № 12. P. 2363–2374.
- Ham O., Jin Y.B., Kim J. et al. Blood vessel formation in cerebral organoids formed from human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 521. № 1. P. 84–90.
- Hansen D.V., Lui J.H., Parker P.R. et al. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 554–561.
- Harbuzariu A., Pitts S., Cespedes J.C. et al. Modelling heme-mediated brain injury associated with cerebral malaria in human brain cortical organoids // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19162.
- Harding A., Cortez-Toledo E., Magner N.L. et al. Highly efficient differentiation of endothelial cells from pluripotent stem cells requires the MAPK and the PI3K pathways // *Stem. Cells*. 2017. V. 35. № 4. P. 909–919.
- Harrison R.G. Observations of the living developing nerve fiber // *Anat. Rec.* 1907. V. 1. № 5. P. 116–128.
- Heide M., Huttner W.B., Mora-Bermúdez F. Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2018. № 55. P. 8–16.
- He Z., Han D., Efimova O. et al. Comprehensive transcriptome analysis of neocortical layers in humans, chimpanzees and macaques // *Nat. Neurosci.* 2017. V. 20. № 6. P. 886–895.
- Hogue M.J. Tissue cultures of the brain; intercellular granules // *J. Comp. Neurol.* 1946. V. 85. № 3. P. 519–530.
- Homem C.C., Repic M., Knoblich J.A. Proliferation control in neural stem and progenitor cells // *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. № 11. P. 647–659.
- Hong Y.J., Do J.T. Neural lineage differentiation from pluripotent stem cells to mimic human brain tissues // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. Dec. 6. 7: 400.
- Hyun I., Scharf-Deering J.C., Lunshof J.E. Ethical issues related to brain organoid research // *Brain Res.* 2020. Feb. 1: 146653.
- Itsykson P., Ilouz N., Turetsky T. et al. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin // *Mol. Cell. Neurosci.* 2005. V. 30. P. 24–36.
- Jo J., Xiao Y., Sun A.X. et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons // *Cell. Stem. Cell*. 2016. V. 19. № 2. P. 248–257.
- Kanton S., Boyle M.J., He Z. et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development // *Nature*. 2019. V. 574. № 7778. P. 418–422.

- Kadoshima T., Sakaguchi H., Nakano T. et al.* Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 50. P. 20284–20289.
- Knight G.T., Lundin B.F., Iyer N. et al.* Engineering induction of singular neural rosette emergence within hPSC-derived tissues // *Elife*. 2018. Oct. 29; 7. pii: e37549.
- Koo B., Choi B., Park H. et al.* Past, present, and future of brain organoid technology // *Mol. Cells*. 2019. V. 42. № 9. P. 617–627.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A. et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 373–379.
- Lancaster M.A., Corsini N.S., Wolfinger S. et al.* Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2017. V. 35. № 7. P. 659–666.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A.* Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 10. P. 2329–2340.
- Lehtinen M.K., Zappaterra M.W., Chen X. et al.* The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells // *Neuron*. 2011. V. 69. № 5. P. 893–905.
- Luo C., Lancaster M.A., Castanon R. et al.* Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain // *Cell Rep*. 2016. V. 17. № 12. P. 3369–3384.
- Lui J.H., Hansen D.V., Kriegstein A.R.* Development and evolution of the human neocortex // *Cell*. 2011. V. 146. № 1. P. 18–36.
- Mak I.W., Evaniew N., Ghert M.* Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment // *Am. J. Transl. Res.* 2014. V. 6. P. 114–118.
- Mansour A.A.F., Gonçalves J.T., Bloyd C.W. et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 432–441.
- Mariani J., Simonini M.V., Palejev D. et al.* Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 31. P. 12770–12775.
- Marotta N., Kim S., Krainc D.* Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery // *Expert Opin. Drug Discov.* 2020. Jan. 3. P. 1–15.
- Marshall J.J., Mason J.O.* Mouse vs man: Organoid models of brain development & disease // *Brain Res.* 2019. Dec. 1; 1724: 146427.
- Marton R.M., Paşca S.P.* Neural differentiation in the third dimension: Generating a human midbrain // *Cell. Stem. Cell*. 2016. V. 19. № 2. P. 145–146.
- Megraw T.L., Sharkey J.T., Nowakowski R.S.* Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes // *Trends Cell Biol.* 2011. V. 21. № 8. P. 470–480.
- Miller J.D., Ganat Y.M., Kishinevsky S. et al.* Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging // *Cell. Stem. Cell*. 2013. V. 13. № 6. P. 691–705.
- Mlakar J., Korva M., Tul N. et al.* Zika virus associated with microcephaly // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 374. № 10. P. 951–958.
- Moscona A.* Effect of temperature on adhesion to glass and histogenetic cohesion of dissociated cells // *Nature*. 1961. V. 190. P. 408–409.
- Monzel A.S., Smits L.M., Hemmer K. et al.* Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells // *Stem. Cell. Reports*. 2017. V. 8. № 5. P. 1144–1154.
- Mostajo-Radji M.A., Schmitz M.T., Montoya S.T. et al.* Reverse engineering human brain evolution using organoid models // *Brain. Res.* 2019. Feb. 15; 1729: 146582.
- Muñoz-Sanjuán I., Brivanlou A.H.* Neural induction, the default model and embryonic stem cells // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 271–280.
- Muotri A.R.* Brain organoids and insights on human evolution // *F1000Res*. 2019. May 30;8. pii: F1000 Faculty Rev-760.
- Nascimento J.M., Saia-Cereda V.M., Sartore R.C. et al.* Human cerebral organoids and fetal brain tissue share proteomic similarities // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019. Nov. 28. 7: 303.
- Nowakowski T.J., Rani N., Golkaram M. et al.* Regulation of cell-type-specific transcriptomes by microRNA networks during human brain development // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 12. P. 1784–1792.
- Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E. et al.* Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7413.
- Oberheim N.A., Takano T., Han X. et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 10. P. 3276–3287.
- Ormel P.R., Vieira de Sá R., van Bodegraven E.J. et al.* Microglia innately develop within cerebral organoids // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4167.
- Otani T., Marchetto M.C., Gage F.H. et al.* 2D and 3D stem cell models of primate cortical development identify species-specific differences in progenitor behavior contributing to brain size // *Cell. Stem. Cell*. 2016. V. 18. № 4. P. 467–480.
- Pacitti D., Privolizzi R., Bax B.E.* Organs to cells and cells to organoids: The evolution of in vitro central nervous system modelling // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. Apr. 9. V. 13. P. 129.
- Pamies D., Hartung T., Hogberg H.T.* Biological and medical applications of a brain-on-a-chip // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2014. V. 239. № 9. P. 1096–1107.
- Paşca A.M., Sloan S.A., Clarke L.E. et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 7. P. 671–678.
- Podgornyi O.V., Poltavtseva R.A., Marei M.V. et al.* Formation of neuroepithelial structures in culture of neural stem cells from human brain // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005. V. 140. № 1. P. 113–117.
- Prodromidou K., Matsas R.* Species-specific miRNAs in human brain development and disease // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. Dec. 18; 13: 559.
- Perrin S.* Preclinical research: make mouse studies work // *Nature*. 2014. V. 507. P. 423–425.

- Pham M.T., Pollock K.M., Rose M.D. et al. Generation of human vascularized brain organoids // *Neuroreport*. 2018. V. 29. № 7. P. 588–593.
- Pollen A.A., Nowakowski T.J., Chen J. et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development // *Cell*. 2015. V. 163. № 1. P. 55–67.
- Pollen A.A., Bhaduri A., Andrews M.G. et al. Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution // *Cell*. 2019. V. 176. № 4. P. 743–756.e17.
- Pothayee N., Maric D., Sharer K. et al. Neural precursor cells form integrated brain-like tissue when implanted into rat cerebrospinal fluid // *Commun. Biol*. 2018. Aug. 14. № 1. P. 114.
- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M. et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure // *Cell*. 2016. V. 165. № 5. P. 1238–1254.
- Qian X., Nguyen H.N., Jacob F. et al. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly // *Development*. 2017. V. 144. № 6. P. 952–957.
- Qian X., Jacob F., Song M.M. et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor // *Nat. Protoc*. 2018. V. 13. № 3. P. 565–580.
- Qian X., Song H., Ming G.L. Brain organoids: advances, applications and challenges // *Development*. 2019. V. 146. № 8. pii: dev166074.
- Quadrato G., Nguyen T., Macosko E.Z. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids // *Nature*. 2017. V. 545. № 7652. P. 48–53.
- Ranga A., Girgin M., Meinhardt A. et al. Neural tube morphogenesis in synthetic 3D microenvironments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 44. E6831–E6839.
- Raja W.K., Mungenast A.E., Lin Y.T. et al. Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. e0161969.
- Reynolds B.A., Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell // *Dev. Biol*. 1996. V. 175. № 1. P. 1–13.
- Sakaguchi H., Kadoshima T., Soen M. et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue // *Nat. Commun*. 2015. V. 6. № 8896.
- Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture // *Cell. Stem. Cell*. 2013. V. 12. № 5. P. 520–530.
- Seo J., Kritskiy O., Watson L.A. et al. Inhibition of p25/Cdk5 attenuates tauopathy in mouse and iPSC models of frontotemporal dementia // *J. Neurosci*. 2017. V. 37. № 4. P. 9917–9924.
- Simian M., Bissell M.J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions // *J. Cell. Biol*. 2017. V. 216. № 1. P. 31–40.
- Shen Q., Goderie S.K., Jin L. et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells // *Science*. 2004. V. 304. № 5675. P. 1338–1340.
- Sloan S.A., Darmanis S., Huber N., Khan T.A. et al. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells // *Neuron*. 2017. V. 95. № 4. P. 779–790.e6.
- Smukler S.R., Runciman S.B., Xu S. et al. Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences // *J. Cell. Biol*. 2006. V. 172. P. 79–90.
- Sousa A.M.M., Meyer K.A., Santpere G. et al. Evolution of the human nervous system function, structure, and development // *Cell*. 2017. V. 170. P. 226–247.
- Sun A.X., Ng H.H., Tan E.K. Translational potential of human brain organoids // *Ann. Clin. Transl. Neurol*. 2018. V. 5. № 2. P. 226–235.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Taverna E., Götz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 2014. V. 30. P. 465–502.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Todd G.K., Boosalis C.A., Burzycki A.A. et al. Towards neuronal organoids: a method for long-term culturing of high-density hippocampal neurons // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. e58996.
- Trevino A.E., Sinnott-Armstrong N., Andersen J. et al. Chromatin accessibility dynamics in a model of human forebrain development // *Science*. 2020. V. 367. № 6476. pii: eaay164.
- Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C. et al. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism // *Neuron*. 2001. V. 30. P. 65–78.
- Vescovi A.L., Parati E.A., Gritti A. et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation // *Exp. Neurol*. 1999. V. 156. № 1. P. 71–83.
- Wang S.N., Wang Z., Xu T.Y. et al. Cerebral organoids repair ischemic stroke brain injury // *Transl Stroke Res*. 2019. Dec. 30.
- Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A. et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // *Nat. Neurosci*. 2005. V. 8. № 3. P. 288–296.
- Winanto, Khong Z.J., Hor J.H. et al. Spinal cord organoids add an extra dimension to traditional motor neuron cultures // *Neural. Regen. Res*. 2019. V. 14. № 9. P. 1515–1516.
- Xiang Y., Tanaka Y., Patterson B. et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 21. № 3. P. 383–398.e7.
- Xu R., Brawner A.T., Li S., Liu J.J. et al. OLIG2 drives abnormal neurodevelopmental phenotypes in human iPSC-based organoid and chimeric mouse models of down syndrome // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 24. № 6. P. 908–926.e8.

- Yakoub A.M., Sadek M.* Development and characterization of human cerebral organoids: An optimized protocol // *Cell Transplant.* 2018. V. 27. № 3. P. 393–406.
- Yakoub A.M., Sadek M.* Analysis of synapses in cerebral organoids // *Cell Transplant.* 2019. V. 28. № 9–10. P. 1173–1182.
- Yakoub A.M.* Cerebral organoids exhibit mature neurons and astrocytes and recapitulate electrophysiological activity of the human brain // *Neural. Regen. Res.* 2019. V. 14. № 5. P. 757–761.
- Yin X., Mead B.E., Safaee H. et al.* Engineering stem cell organoids // *Cell Stem. Cell.* 2016. V. 18. № 1. P. 25–38.
- Ying Q.L., Stavridis M., Griffiths D. et al.* Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 2. P. 183–186.
- Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al.* In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 1129–1133.
- Ziller M.J., Edri R., Yaffe Y. et al.* Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting // *Nature.* 2015. V. 518. № 7539. P. 355–359.
- Ziv O., Zaritsky A., Yaffe Y. et al.* Quantitative live imaging of human embryonic stem cell derived neural rosettes reveals structure-function dynamics coupled to cortical development // *PLoS. Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 10. e1004453.

## Cerebral Organoids: Brain Development Model

**K. K. Sukhinich<sup>1</sup>, \* and M. A. Aleksandrova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russian*

*\*e-mail: transpl@hotmail.com*

At the moment, the development of the human brain in normal and pathological conditions cannot be fully reproduced in animal models, which leads to the necessity to search for alternative solutions. In recent years, significant successes have been achieved in the development of methods of culturing of the human brain cerebral organoids. Cerebral organoids are 3D cultures in which brain-specific cell types develop from embryonic or induced pluripotent stem cells. In cerebral organoids, due to self-organization of nervous tissue, unique features of the development of the human brain are reproduced, which are absent in the developing brain of rodents. However, they are not an exact copy, therefore, overcoming a number of restrictions will expand our ability to study the development and disorders of the human brain in the future. Obviously, modeling of cerebral organoids is already opening up prospects for both basic and clinical research. In this review, we discuss methods of nerve tissue culturing, production methods of cerebral organoids, features of their self-organization, modeling of normal development processes and brain pathology.

*Keywords:* cerebral organoids, 3D cultures, brain development, neurogenesis, human radial glia

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 591.3

ГЕТЕРОХРОНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Lanf* И *FoxG1* У МИНОГИ  
ПОДТВЕРЖДАЕТ ПОЯВЛЕНИЕ КОНЕЧНОГО МОЗГА  
КАК ЭВОЛЮЦИОННО МОЛОДОЙ НАДСТРОЙКИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ  
НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2020 г. Г. В. Ермакова<sup>а</sup>, А. В. Кучерявый<sup>б</sup>, А. Г. Зарайский<sup>а</sup>, А. В. Байрамов<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997 Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН, Ленинский проспект, д. 33, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: andrbayr@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

Одной из важнейших эволюционных инноваций позвоночных является сложноструктурированный конечный мозг – теленцефалон, обеспечивающий высшие формы нервной деятельности у животных и человека. Эта работа посвящена исследованию вопроса появления конечного мозга на ранних этапах эволюции позвоночных. Есть основания полагать, что у миног, в силу их эволюционной древности, могли сохраниться некоторые паттерны экспрессии, характерные для генов, регулирующих развитие конечного мозга у самых первых позвоночных. Поэтому исследование особенностей пространственно-временных паттернов экспрессии ключевых генов-регуляторов развития конечного мозга у миног по сравнению с другими позвоночными может помочь понять молекулярные механизмы, лежавшие в основе появления и эволюционного развития этой уникальной структуры позвоночных. В этой статье приводятся результаты анализа динамики экспрессии некоторых маркеров конечного мозга и структур осевого комплекса органов, *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* и *HoxB9*, на ранних стадиях развития Европейской речной миноги *Lampetra fluviatilis*. Показано, что у генов миног, участвующих в дифференцировке конечного мозга (*Lanf* и *FoxG1*), наблюдается гетерохрония экспрессии по сравнению с более эволюционно продвинутым представителем позвоночных – шпорцевой лягушкой *Xenopus laevis*. Это подтверждает идею о том, что конечный мозг, являясь наиболее эволюционно молодым отделом центральной нервной системы, мог появиться у предков позвоночных в качестве надстройки на поздних стадиях их эмбрионального развития.

**Ключевые слова:** *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid*, *HoxB9*, круглоротые, миноги, *Lampetra fluviatilis*, развитие конечного мозга

**DOI:** 10.31857/S0475145020040047

## ВВЕДЕНИЕ

Проблемы изучения механизмов формирования конечного мозга в онтогенезе, а также исследование факторов, которые могли привести к его появлению в эволюции являются на сегодняшний день актуальными в биологии развития. Настоящая работа посвящена рассмотрению вопроса появления конечного мозга в эволюции позвоночных в контексте молекулярных механизмов, обеспечивающих дифференцировку этого отдела центральной нервной системы. Тот факт, что все остальные типы многоклеточных животных, включая ближайших родственников позвоночных низших хордовых (ланцетники и оболочни-

ки) не имеют структур гомологичных конечному мозгу указывает, на то, что, по всей видимости, он появился в эволюции только у предков современных позвоночных. В связи с этим, важным является вопрос о генетических механизмах, лежащих в основе данного ароморфоза. Согласно теории филэмбриогенеза А.Н. Северцова, одним из путей появления новых признаков в эволюции является надставка конечных стадий. В ходе последующей эволюции время их закладки может смещаться в сторону более ранних стадий, из-за чего наблюдаются гетерохронии в развитии тех или иных структур у животных, принадлежащих к разным филогенетическим группам.

В контексте изучения механизмов появления в эволюции и развития конечного мозга, миноги являются уникальным объектом, как самые древние из ныне живущих позвоночных, у которых имеется конечный мозг. Поскольку ветвь миног отделилась от общего ствола позвоночных на самых ранних этапах их эволюции, около 500 миллионов лет назад (Kuraki, Kuratani, 2006; Feinberg, Mallatt, 2013), у них с большой вероятностью, мог сохраниться древний тип экспрессионных паттернов генов-регуляторов развития конечного мозга, характерный для предковых форм позвоночных.

В данной работе мы провели сравнение на ранних стадиях эмбриогенеза пространственно-временных паттернов экспрессии, описанных нами ранее регуляторов раннего развития конечного мозга Европейской речной миноги *Lampetra fluviatilis*, *Anf* (*Lanf*) и *FoxG1*, с паттернами экспрессии их ортологов у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Также было проведено аналогичное сравнение для генов, экспрессирующихся в Шпемановском организаторе (*Gooseoid*), в туловищном отделе (*HoxB9*) и в среднем отделе мозга (*Otx2*). В результате мы установили, что экспрессия генов, необходимых для развития конечного мозга (*Anf* и *FoxG1*) у речной миноги активируется на гораздо более поздних стадиях развития, чем у шпорцевой лягушки. При этом, у остальных проанализированных генов подобной гетерохронии не наблюдается. Если считать, что динамика экспрессии выбранных генов-регуляторов определяет динамику программ, ответственных за эмбриональное развитие, то обнаруженная нами гетерохрония в начале экспрессии *Anf* и *FoxG1* в эмбриогенезе миноги и шпорцевой лягушки свидетельствует об относительно более поздней спецификации зачатка конечного мозга у миноги. В свою очередь, в силу биогенетического закона, это может свидетельствовать о сравнительно недавнем, по сравнению с другими отделами ЦНС, появлении конечного мозга в эволюции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные

Взрослые половозрелые особи *Lampetra fluviatilis* были выловлены в Ленинградской области. Зародыши получались путем искусственного оплодотворения в лабораторных условиях. Икра половозрелых самок сдаивалась в контейнер и ак-

тивировалась в растворе 0.1× MMR (температура 12°C) в течение 3 минут при постоянном помешивании. После активации в раствор добавлялась сперма половозрелого самца, икра инкубировалась 10 минут при постоянном помешивании. После оплодотворения икра дважды промывалась раствором 0.1× MMR. Инкубация осуществлялась в чашках Петри (9 см) на 12 градусах по Цельсию. Стадии определялись согласно Tahara (Tahara, 1988). Для гибридизации *in situ* зародыши фиксировались в растворе MEMFA. Зародыши шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* были получены в лаборатории путем искусственного оплодотворения (Sive et al., 2000), стадии определялись согласно таблицам нормального развития Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1967).

### Обратная транскрипция-ПЦР

Для количественного ПЦР в реальном времени были отобраны три группы по 50 зародышей *L. fluviatilis* указанных стадий развития. Тотальная РНК была выделена с помощью набора для выделения РНК MASHEREY-NAGEL согласно протоколу производителя. 250 нг тотальной РНК, выделенной из каждой пробы, было использовано для обратной транскрипции с помощью ревертазы M-MLV фирмы Promega в присутствии 10 пмоль олиго-dT праймера фирмы Evrogen согласно протоколу. В качестве контроля использовалась аналогичная реакционная смесь без ревертазы (–ОТ контроль). Количественный ПЦР был проведен на приборе DTPrim4 фирмы ДНК Технология, с использованием 2 мкл первой цепи (или –ОТ контроля) на реакцию и применением 5-кратной реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR фирмы Evrogen. В реакции использовались указанные ниже праймеры в финальной концентрации 5 пмоль каждый, а общий объем реакции доводился до 25 мкл водой, очищенной в приборе milli-Q. Для ПЦР использовалась стандартная программа из 40 циклов с горячим стартом. Данные ПЦР импортировались в Microsoft Excel и анализировались методом ΔΔC<sub>t</sub>. Нормализация полученных результатов проводилась по двум контрольным генам: орнитиндекарбоксилазе (*ODC*) и фактору элонгации (*EF1alpha*). Для количественного ПЦР в реальном времени использовались следующие пары праймеров:

*Lanf*-ОТ-ПЦР-прямой GGCCTCGCACGTCCTTCA и

*Lanf*-ОТ-ПЦР-обратный STCGTCCACGCCGACTCT;

*FoxG1*-ОТ-ПЦР-прямой STTTCGGGACTTACCGTTCCA и

*FoxG1*-ОТ-ПЦР-обратный CCACTTGACTTTGCTGCTGA;

*Otx2*-ОТ-ПЦР-прямой GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA и  
*Otx2*-ОТ-ПЦР-обратный CCTCTCAGAGCACCTGGAАСТТ;

*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-прямой GACACGAGGACAACCGAGAG и  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-обратный ATCACAATCACACGGGCACAA;

*HoxB9*-ОТ-ПЦР-прямой CTGCCCTACACCAAGTTCC и  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-обратный GATCTTACCTGGCGCTCG;

*EF1alpha*-ОТ-ПЦР-прямой AGAACGTGTCTGTCAAGGATGT и  
*EF1alpha*-ОТ-ПЦР-обратный TAGCCGGCATTGATCTGGCCA;

*ODC*-ОТ-ПЦР-прямой CCGTCCGGTATCATCGCCAAG и  
*ODC*-ОТ-ПЦР-обратный CGAAGAGGATGCAGTTGAAG;

*X. laevis*:

*OTX2a*-ОТ-ПЦР-прямой TTCAATGCTGACTGCTTGGAT и  
*OTX2a*-ОТ-ПЦР-обратный AGATGAGGTTTGGCCCGAG;

*FoxG1*-ОТ-ПЦР-прямой AACAAAGCAGGGCTGGCAGAA и  
*FoxG1*-ОТ-ПЦР-обратный CCGCTCTATCCATAAAGGTG;

*Xanf1*-ОТ-ПЦР-прямой CCGCAGAAGAGGAGACAAAG и  
*Xanf1*-ОТ-ПЦР-обратный TAGTGAAAGCAGTTCGGGGT;

*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-прямой AGTGCCTCACCAAATGCTCC и  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-обратный GTGAAGATGGTCTGTGCCT;

*HoxB9*-ОТ-ПЦР-прямой AAAGTGTGTGAAGCCAACGC и  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-обратный TTCTTTCTGGAGGAGCGAGC;

*EF*-ОТ-ПЦР-прямой TCATACAGCTCATATTGCTTGTAAAGT и  
*EF*-ОТ-ПЦР-обратный CAAGTGGAGGATAGTCTGAGAA;

*ODC*-ОТ-ПЦР-прямой GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC и  
*ODC*-ОТ-ПЦР-обратный TTCGGGTGATTCCTTGCCAC.

#### Гибридизация *in situ*

Фрагменты генов *Lanf*, *FoxG1* и *Otx2* для гибридизации *in situ* были получены методом ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

*FoxG1*-прямой GCCTCAACAAGTGCTTCGTGAAGGT и  
*FoxG1*-обратный GTTATATACAGTTTGTATTTACAAGCCAT;

*Otx2*-прямой GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA и  
*Otx2*-обратный CCTCTCAGAGCACCTGGAАСТТ;

*Lanf*-прямой CGGCGCTCCAGAAGTTCATTCTC и  
*Lanf*-обратный CACCGCGCGGAGCTGCGACTCG.

Для ПЦР использовался набор фирмы Evrogen с полимеразой Епсусю. Полученные кДНК фрагменты были клонированы в вектор *pAL2-T* (Evrogen) и отсеквенированы.

Гибридизация *in situ* была проведена на целых зародышах согласно протоколу, описанному в Sugahara et al., 2015. Оболочку зародышей удаляли

микропинцетом до фиксации. Фиксацию проводили в растворе параформальдегида (MEMFA) в течение ночи на 4°C. Предгибризационный и гибридизационный буфер содержали: 50% формамид, 5× SSC, 100 мкг/мл гепарин, 100 мкг/мл tRNA, 5 мМ EGTA, 1% CHAPS, 2% Tween20. После предгибризации (1 ч 70°C), зародыши ин-

кубировались ночь на 70°C в гибридизационном буфере, содержащем 5 мкг/мл Dig-меченой РНК пробы, промывались (дважды в гибридизационном буфере, дважды в двухкратном растворе SSC на 70°C, дважды в 0.2-кратном растворе SSC при комнатной температуре, а также в растворе MAB) и инкубировались в блокирующем буфере (MAB + + 2% блокирующего реагента (Roch) + 20% телячьей сыворотки (Sigma)) 2 часа при комнатной температуре. Затем эмбрионы инкубировались с антиDig-Fab фрагментом, конъюгированным с алкальной фосфатазой (фирмы Roche, разведение 1 : 1500 в блокирующем буфере) в течение ночи на 4°C.

Затем эмбрионы были 8 раз промыты в буфере MABT (MAB + 0.1% Triton X100) и помещены в алкалинфосфатазный буфер на 20 мин при комнатной температуре. Краситель BM purple (Roch) был использован для проявки.

30 мкм срезы гибридизованных эмбрионов выполнялись на вибраторе Microm HM 650 (зародыши помещались в 4% агарозные блоки).

Фотографирование производилось на стереомикроскопе Leica M205.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Гены, выбранные для сравнения программ развития конечного мозга и туловищного отдела у эмбрионов миноги и шпорцевой лягушки*

В качестве маркеров динамики развертывания генетических программ развития конечного мозга и туловищного отдела тела эмбрионов миноги и шпорцевой лягушки были использованы паттерны экспрессии следующих генов: *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Gooseoid* и *HoxB9*. Далее приводится краткая характеристика каждого из этих генов.

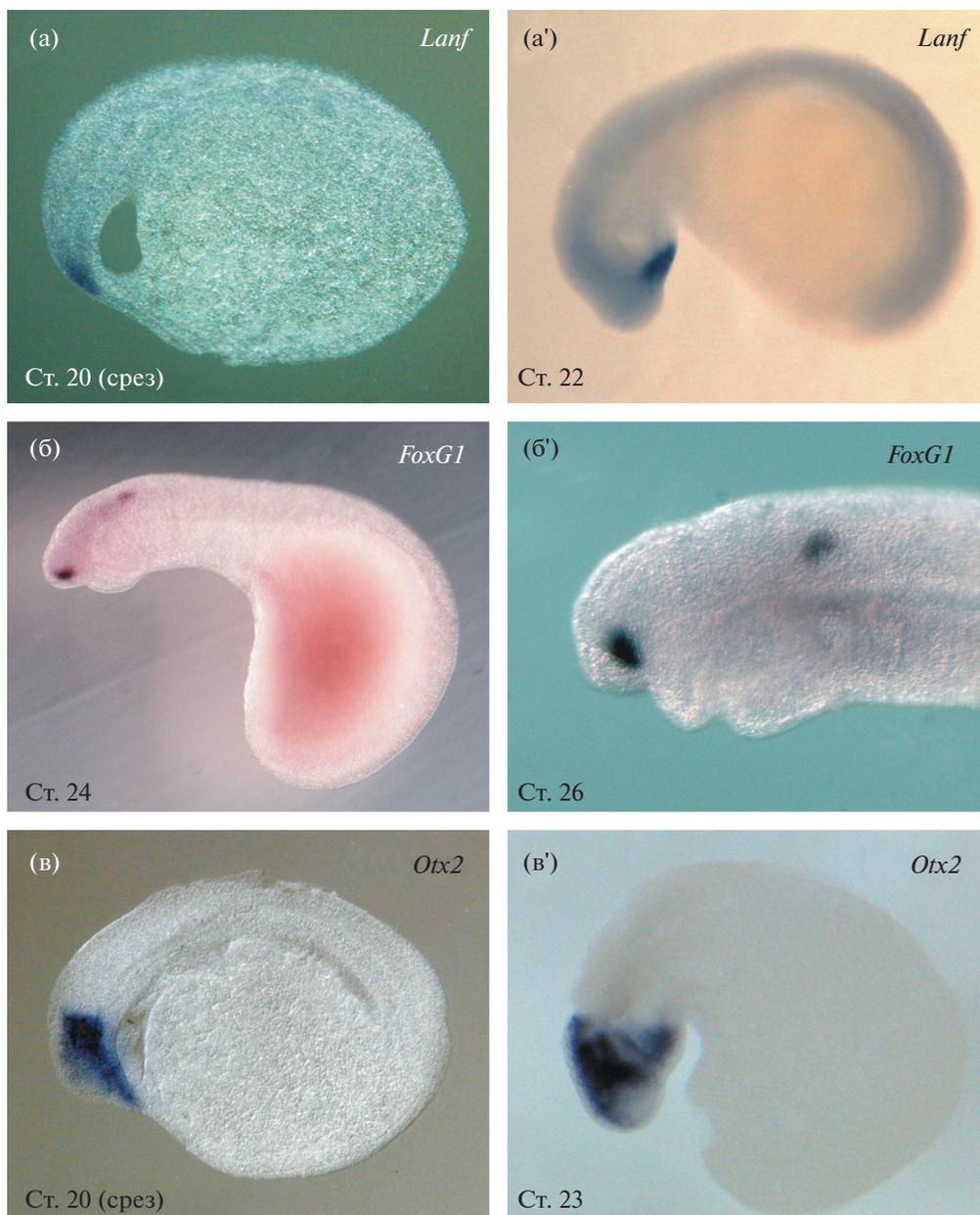
Гомеобоксные гены класса *Anf/Hesx1* (далее *Anf*) являются одним из ключевых регуляторов развития переднего мозга позвоночных. Впервые ген *Anf* был описан в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН в 1992 году у шпорцевой лягушки (Zaraisky et al., 1992). Исследования, проведенные впоследствии показали, что в клетках зачатка переднего мозга белок *Anf* играет роль специфического репрессора транскрипции, подавляя экспрессию генов, индуцирующих дифференцировку задних отделов мозга (Ermakova et al., 1999, 2007; Eroshkin et al., 2002; Martynova et al., 2004; Bayramov et al., 2004). Нам удалось обнаружить и клонировать кДНК гомологов *Anf* у трех видов миног *Lethenteron camtschaticum*, *Lampetra fluviatilis* и *Petromyzon marinus* (Bayramov et al., 2016). Экспрессия гена *Lanf* обнаруживается у речной миноги методом гибридизации *in situ* начиная со стадии поздней нейрулы (ст. 20 по Tahara, 1988) на переднем конце формирующейся нервной системы (рис. 1а, 1а'). Как уже отмечалось нами ранее

(Байрамов и др., 2017), такой пространственный паттерн экспрессии *Lanf* у миног в целом соответствует паттерну экспрессии генов *Anf* у других групп позвоночных.

Поскольку впервые в эволюции конечный мозг появляется именно у миног, обнаружение у представителей этой группы гомологов гена *Anf* стало важным подтверждением выдвинутой нами ранее гипотезы о том, что появление у позвоночных генов класса *Anf* могло быть одним из ключевых факторов, создавших условия для возникновения у них конечного мозга (Bayramov et al., 2016; Байрамов и др., 2017). В частности, мы показали, что у миноги, так же, как у шпорцевой лягушки, *Anf* ингибирует экспрессию *Otx2* в области будущего переднего мозга, тем самым как бы “очищая” переднюю часть нервной пластинки от экспрессии этого регулятора развития более каудальных отделов мозга. Это позволяет клеткам в передней части нервной пластинки начать экспрессировать один из важнейших регуляторов развития конечного мозга – *FoxG1*.

Белок, кодируемый геном *FoxG1*, относится к семейству Forkhead-связывающих транскрипционных факторов и играет ключевую роль в индукции и пространственной организации развития конечного мозга у позвоночных. Эксперименты по подавлению и усилению его функции показали, что *FoxG1* участвует в развитии нейронов вентральной (подкорковой) зоны конечного мозга. Экспрессия *FoxG1* в переднем отделе мозга достаточно консервативна у разных групп позвоночных и, поэтому этот ген часто применяется в качестве маркера данного отдела мозга (Kumamoto, Hanashima, 2017). У всех исследованных позвоночных *FoxG1* (ранее также известный как *BF-1*), является одним из первых транскрипционных факторов, экспрессирующихся в передней части нервной пластинки – области будущего конечного мозга и в дальнейшем его экспрессия сохраняется до зрелых стадий (Danesin, Houart, 2012). Было показано, что ген *FoxG1* имеет важное значение для многих аспектов развития конечного мозга и выживания нейронов в коре головного мозга у взрослых организмов. Нокаут *FoxG1* у рыб и мышей приводит к редукции вентральной области конечного мозга, что отражается в вентральной экспансии маркеров дорсальной части конечного мозга (Martynova et al., 2005; Danesin et al., 2009). У человека мутации гена *FOXG1* приводят к нарушениям развития, таким как синдром Ретта, эпилепсия, постнатальная микроцефалия, тяжелая умственная отсталость, нарушения речи, дискинезия и гипогенез мозолистого тела (Kortum et al., 2011; Danesin, Houart, 2012).

Пространственный паттерн экспрессии *FoxG1* у речной миноги в целом соответствует паттернам экспрессии *FoxG1* у других позвоночных, в том



**Рис. 1.** Паттерны экспрессии генов *Lanf*, *FoxG1* и *Otx2* в раннем развитии Европейской речной миноги показаны методом гибридизации *in situ*. а – на стадии 20 ген *Lanf* экспрессируется в передней части нервной системы – области будущего теленцефалона и диенцефалона. а' – на стадии 22 уровень экспрессии гена *Lanf* уменьшается в области переднего мозга и возрастает в ротовой эктодерме и гипофизарной плакоде. б, б' – ген *FoxG1* экспрессируется в области будущего теленцефалона и ушных плакодах. в – на стадии 20 ген *Otx2* экспрессируется в области будущего переднего и среднего отделов мозга. в' – на стадии 23 ген *Otx2* экспрессируется в области будущего промежуточного и среднего отделов мозга.

числе у шпорцевой лягушки. В тоже время имеется и ряд отличий. Так, экспрессия *FoxG1* у миноги впервые в развитии детектируется в формирующихся ушных плакодах и вентральной части теленцефалона (рис. 1б, 1б'). При этом у миноги *FoxG1* совсем не экспрессируется в дорзальной части теленцефалона, тогда как у других позвоночных экспрессия этого гена в теленцефалоне

носит градиентный характер, с возрастанием интенсивности от дорзальной части к вентральной (Danesin, Houart, 2012). Также у миноги в отличие от других позвоночных экспрессия *FoxG1* не обнаруживается в формирующихся глазных структурах, что может объясняться особенностью развития этих структур у миног. В отличие от челюстноротых у миног наблюдается

двухступенчатое развитие глаза и зрительного нерва. На эмбриональной стадии глаз покрыт толстой непрозрачной кожей, хрусталик незрелый что, возможно, указывает на примитивное состояние зрительной системы позвоночных (Melendez-Ferro et al., 2002; Suzuki et al., 2015). В этот период образуется небольшое количество волокон зрительного нерва. Позже в онтогенезе формируются новые оптические волокна, и после метаморфоза у взрослых миог развиваются полноценные глазные камеры.

Гомеодомный транскрипционный фактор *Otx2* играет важную роль в формировании переднего мозга и развитии глазных структур (Beby, Lamonegic, 2013). Было показано, что эктопическая экспрессия *Otx2* приводит у шпорцевой лягушки к уменьшению размеров туловищного отдела и появлению вторичной железы вылупления (Boyl et al., 2001). Фактор *Otx2* вовлечен в молекулярный механизм, обеспечивающий дифференцировку глутаматэргических нейронов в таламусе путем репрессии транскрипционного регулятора *Mash1*. Кроме развития нейронов таламуса, *Otx2* также вовлечен в дифференцировку и последующее развитие и пролиферацию мезенцефалических дофаминэргических предшественников. Нокаут *Otx2* летален, а у гомозиготных эмбрионов полностью отсутствуют структуры переднего и среднего отделов мозга. При экспериментальном понижении уровня экспрессии гена *Otx2* наблюдаются нарушения развития средних отделов мозга (Bozzy, Simeone, 2014).

Экспрессия гомеобоксного гена *Gooseoid* (*Gsc*) наблюдается в первичном эмбриональном органогенезе как у позвоночных, так и у беспозвоночных (Blum et al., 1992; Broun et al., 1999). При экспериментальной эктопической экспрессии на брюшной стороне, то есть в области противоположной нормальному месту экспрессии, *Gsc* эффективно индуцирует образование вторичных эмбриональных осей у шпорцевой лягушки (Cho et al., 1991). Эта способность *Gsc* имитировать активность Шпемманновского организатора объясняется его хорошо охарактеризованной способностью репрессировать транскрипцию генов, участвующих в функционировании сигнальных каскадов *Wnt8a* и *Wnt4* у разных групп позвоночных. Кроме того, активно исследуется роль гена *Gsc* в регуляции подвижности и миграционного поведения клеток (Ulmer et al., 2017).

Ген *HoxB9*, экспрессирующийся в эктодермальной и мезодермальной тканях, с момента его описания применяется в качестве маркера задних отделов нервной системы (Sharpe et al., 1987).

#### Сравнение временных паттернов экспрессии выбранных генов в раннем развитии миноги и шпорцевой лягушки

Колоколообразный профиль временной экспрессии *Anf* у миноги похож на профиль экспрессии его ортолога у шпорцевой лягушки: достаточно резкое возрастание и последующий спад на более поздних стадиях развития (рис. 2). Однако, в отличие от шпорцевой лягушки у миноги выявляется отчетливая гетерохрония в экспрессии *Anf*, выражающаяся в сдвиге начала экспрессии этого гена на сравнительно более поздние стадии развития. Так, по данным qRT-PCR, у шпорцевой лягушки возрастание экспрессии *Anf* наблюдается еще до начала нейруляции, на стадии поздней гастрюлы, в то время как у миноги данный ген начинает активно экспрессироваться только начиная со стадии поздней нейрулы, что соответствует и данным полученным с помощью метода гибридизации *in situ* (ст. 20 по Tahara, 1988) (рис. 2).

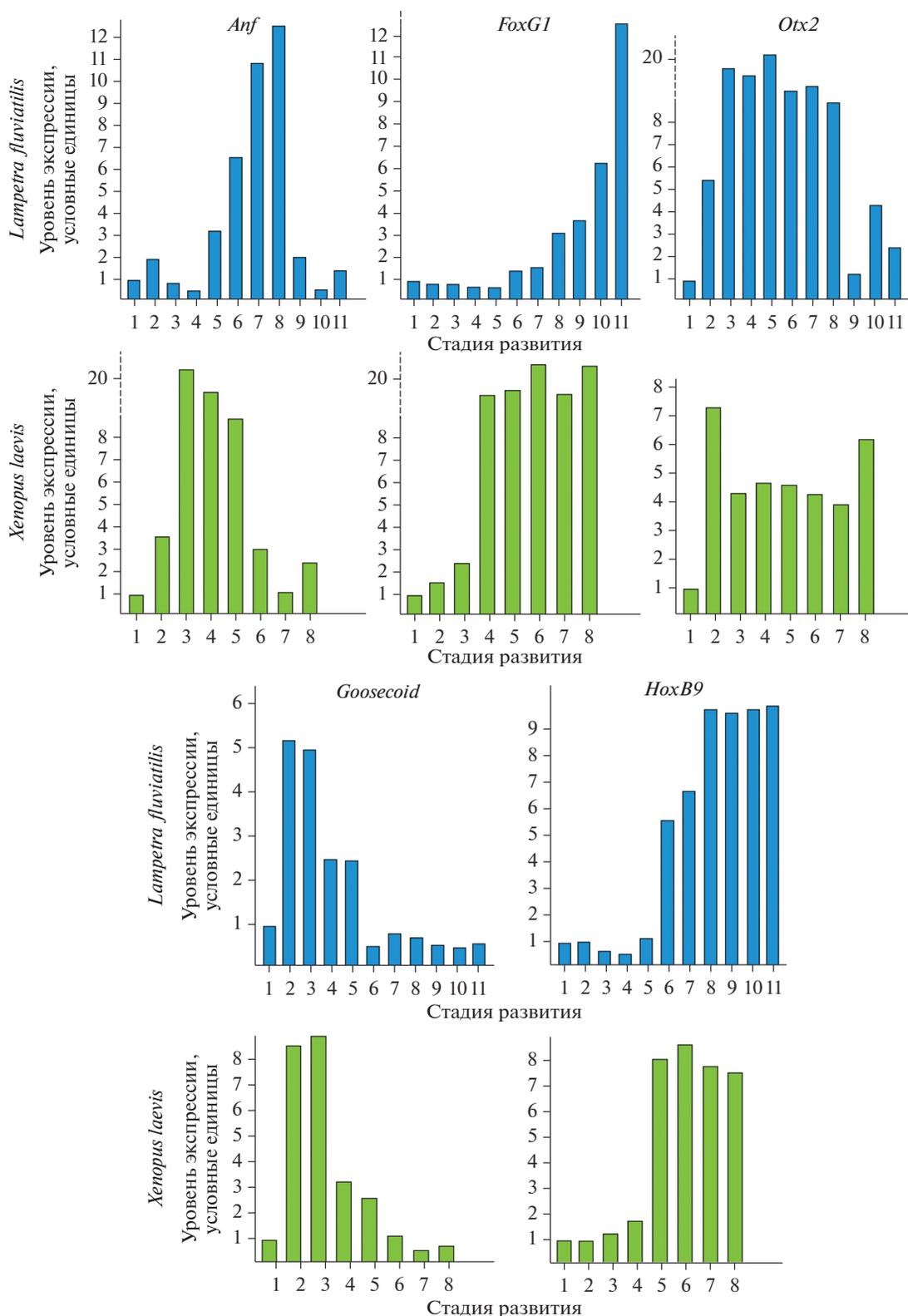
Похожая гетерохрония наблюдается у миноги и в случае гена *FoxG1*. Уровень экспрессии этого гена у речной миноги поддерживается на очень низком уровне во время гастрюляции и нейруляции и начинает повышаться только на стадии роста головы (стадия 21, Tahara, 1988) (рис. 2). После этого постепенное увеличение экспрессии отмечается на стадиях 23, 24 и 26.

В отличие от миноги у шпорцевой лягушки *FoxG1* начинает экспрессироваться уже в конце гастрюляции — начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга. Проведенный нами анализ экспрессии *FoxG1* у шпорцевой лягушки также показал активацию экспрессии этого гена на стадии ранней нейрулы (рис. 2).

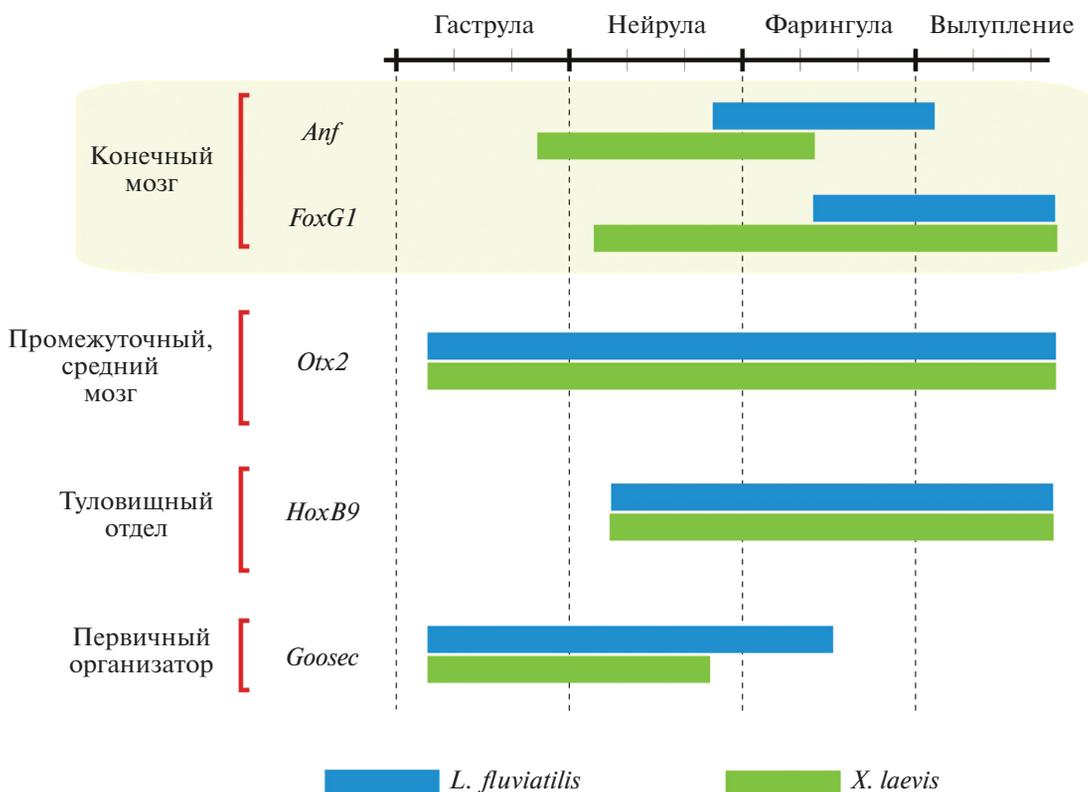
Наиболее наглядно гетерохрония экспрессии *FoxG1* у миноги можно продемонстрировать, если использовать в качестве временного счетчика для сравнения стадий у разных видов количество образовавшихся к данной стадии сомитов (Gorodilov, 1992, 2010). Так, если у остальных изученных позвоночных, *FoxG1* начинает впервые экспрессироваться в зачатке конечного мозга в диапазоне от пресомитной стадии у шпорцевой лягушки до стадии 5–6 сомитов у рыб и млекопитающих (Tao, Lai, 1992; Toresson et al., 1998; Zhao et al., 2009) что в целом соответствует стадии ранней нейрулы, то у миноги экспрессия этого гена обнаруживается в области конечного мозга только на стадии 22 сомитов, т.е. уже после окончания нейруляции (стадия 22 по Tahara, 1988).

Для проверки специфичности полученных результатов, полученных по генам *Lanf* и *FoxG1*, мы провели аналогичный сравнительный анализ для ряда других генов регуляторов раннего развития позвоночных.

Ген *Otx2* у миног экспрессируется в передней части формирующейся нервной системы (рис. 1в, 1в')



**Рис. 2.** Анализ динамики экспрессии генов *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* и *HoxB9* у речной миноги и шпорцевой лягушки, проведенный методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Обозначение проанализированных стадий развития: *L. fluviatilis*: 1 – бластула, 2 – ранняя гастрюла, 3 – поздняя гастрюла, 4 – ранняя нейрула, 5 – поздняя нейрула, 6 – стадия головного выроста-1, 7 – стадия головного выроста-2, 8 – стадия головного выроста-3, 9 – начало самопроизвольных движений, 10 – стадия вылупления, 11 – 3 суток после вылупления. *X. laevis*: 1 – бластула, 2 – ранняя гастрюла, 3 – поздняя гастрюла, 4 – ранняя нейрула, 5 – поздняя нейрула, 6 – стадия 20 (по Nieuwkoop, Faber, 1967), 7 – стадия 23 (по Nieuwkoop, Faber, 1967), 8 – стадия 28 (по Nieuwkoop, Faber, 1967).



**Рис. 3.** Схема проведенного сравнительного анализа динамики экспрессии исследованных генов у речной миноги и шпорцевой лягушки.

и его экспрессия начинается уже на стадии поздней гаструлы как у миноги, так и у шпорцевой лягушки (рис. 2).

Ген *HoxB9*, экспрессия которого обнаруживается в туловищном и хвостовом отделах (Sharpe et al., 1987) также не обнаруживает гетерохронии у миног и амфибий (рис. 2).

Ген *Goosecoid* – один из наиболее ранних маркеров индукции осевых структур и у миног и у амфибий активируется на стадии ранней гаструлы (рис. 2).

Таким образом, на основе проведенного анализа можно заключить, что гетерохрония не является типичным явлением для всех проанализированных генов, участвующих в развитии осевых структур и мозга у миног, а характерна только для генов, вовлеченных в дифференцировку конечного мозга – генов *Anf* и *FoxG1*. Полученные результаты представлены в виде схемы на рис. 3.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Выявленная гетерохрония экспрессии *Lanf* и *FoxG1* у миноги, как одного из наиболее древних представителей позвоночных, может отражать тот факт, что конечный мозг является самым эволюционно молодым отделом головного мозга.

Согласно гипотезе Геккеля, эволюционные инновации могут успешней проходить естественный отбор если они появляются на более поздних стадиях эмбриогенеза, поскольку в этом случае они вносят меньше нарушений в базовую программу онтогенеза (Richardson, Keuck, 2002; Raff, Raff, 2009). Сравнительно поздняя экспрессия *Lanf* и *FoxG1* у миноги, выявленная в этой работе, на уровне экспрессии генов подтверждает более позднюю дифференцировку конечного мозга в онтогенезе миног по сравнению с представителями более эволюционно продвинутых позвоночных. Поскольку на сегодняшний день миноги являются наиболее древними из существующих представителей позвоночных, эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что конечный мозг является наиболее эволюционно молодым отделом мозга, который мог появиться у предков позвоночных на поздних стадиях их эмбрионального развития.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ**

Работа выполнена за счет гранта РФФИ (проект № 18-04-00015). Эксперименты по ОТ-ПЦР на зародышах шпорцевой лягушки выполнены за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00098). Получение серий образцов кДНК ранних стадий раз-

вития шпорцевой лягушки выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 18-29-07014 МК).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними принятые в ИБХ РАН, АСПА'1986 и Хельсинкской декларацией были соблюдены.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Г.В. Ермакова – инкубация зародышей речной миноги, подготовка образцов и проведение гибридизации *in situ*, фоторафирование, подготовка рисунков.

А.В. Кучерявый – получение половозрелых производителей и живых зародышей речной миноги.

А.Г. Зарайский – планирование экспериментов, написание статьи.

А.В. Байрамов – планирование экспериментов, подготовка образцов тотальной РНК и ОТ-ПЦР, написание статьи, подготовка рисунков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M. et al.* The presence of the *Anf/Hesx1* homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39849.
- Bayramov A.V., Martynova N.Yu., Eroshkin F.M. et al.* The homeodomain-containing transcription factor *X-nkx-5.1* inhibits expression of the homeobox gene *Xanf-1* during the *Xenopus laevis* forebrain development // *Mechanism of Development.* 2004. V. 121. P. 1425–1441.
- Beby F., Lamonerie T.* The homeobox gene *Otx2* in development and disease // *Exp. Eye. Res.* 2013. V. 111. P. 9–16.
- Blum M., Gaunt S.J., Cho K.W. et al.* Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *goosecoid* // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1097–1106.
- Boyl P.P., Signore M., Annino A. et al.* *Otx* genes in the development and evolution of the vertebrate brain // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001. V. 19. № 4. P. 353–363.
- Bozzi Y., Simeone A.* *Otx* genes and seizure susceptibility // *Molecular & Cellular Epilepsy.* 2014. V. 1. e74.
- Broun M., Sokol S., Bode H.R.* *Cngsc*, a homologue of *goosecoid*, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra* // *Development* 1999. V. 126. P. 5245–5254.
- Cho K.W., Blumberg B., Steinbeisser H. et al.* Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *goosecoid* // *Cell.* 1991. V. 67. P. 1111–1120.
- Danesin C., Peres J.N., Johansson M. et al.* Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by *Foxg1* // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. № 4. P. 576–587.
- Danesin C., Houart C.* A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. № 4. P. 323–330.
- Eroshkin F., Kazanskaya O., Martynova N. et al.* Characterization of cis-regulatory elements of the homeobox gene *Xanf-1* // *Gene.* 2002. V. 285. P. 279–286.
- Ermakova G.V., Alexandrova E.M., Kazanskaya O.V. et al.* The homeobox gene, *Xanf-1*, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neurectoderm of the *Xenopus laevis* embryo // *Development.* 1999. V. 126. P. 4513–4523.
- Ermakova G.V., Solovieva E.A., Martynova N.Y. et al.* The homeodomain factor *Xanf* represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions // *Developmental Biology.* 2007. V. 307. P. 483–497.
- Feinberg T.E., Mallatt J.* The evolutionary and genetic origins of consciousness in the Cambrian Period over 500 million years ago // *Front Psychol.* 2013. V. 4. P. 667.
- Gorodilov Y.N.* Rhythmic processes in lower vertebrate embryo genesis and their role for developmental control // *Zool. Sci.* 1992. V. 9. P. 1101–1111.
- Gorodilov Y.N.* The biological clock in vertebrate embryogenesis as a mechanism of general control over the developmental organism // *Russian J. Developmental Biology.* 2010. V. 41. P. 243–260.
- Kortüm F., Das S., Flindt M. et al.* The core *FOXP1* syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis // *J. Med. Genet.* 2011. V. 8. № 6. P. 396–406.
- Kumamoto T., Hanashima C.* Evolutionary conservation and conversion of *Foxg1* function in brain development // *Dev. Growth. Differ.* 2017. V. 59. № 4. P. 258–269.
- Kuraku S., Kuratani S.* Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences // *Zoolog. Sci.* 2006. V. 23. № 12. P. 1053–1064.
- Martynova N.Yu., Eroshkin F.M., Ermakova G.V. et al.* Patterning the forebrain: *FoxA4a/Pintallavis* and *Xvent-2* determine the posterior limit of the *Xanf-1* expression in the neural plate // *Development.* 2004. V. 131. P. 2329–2338.
- Martynoga B., Morrison H., Price D.J. et al.* *Foxg1* is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis // *Dev. Biol.* 2005. V. 283(1). P. 113–127.
- Meléndez-Ferro M., Villar-Cheda B., Abalo X.M. et al.* Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: comparative immunocytochemical study // *J. Comp. Neurol.* 2002. V. 442. № 3. P. 250–265.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal Table of *Xenopus laevis* // Amsterdam: North Holland, 1967.
- Raff R.A., Raff E.C.* Evolution in the light of embryos: seeking the origins of novelties in ontogeny // *Forms and Function in Developmental Evolution* / Eds. Laubichler M.D., Maienschein J. Cambridge University Press, 2009.
- Richardson M.K., Keuck G.* Haeckel's ABC of evolution and development // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2002. V. 77. P. 495–528.

- Roth M., Bonev B., Lindsay J. et al. FoxG1 and TLE2 act cooperatively to regulate ventral telencephalon formation // *Development*. 2010. V. 137. № 9. P. 1553–1562.
- Sive H., Grainger R.M., Harland R.M. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, 2000.
- Sharpe C.R., Fritz A., De Robertis E.M. et al. A homeobox-containing marker of posterior neural differentiation shows the importance of predetermination in neural induction // *Cell*. 1987. V. 50. № 5. P. 749–758.
- Suzuki D.G., Murakami Y., Escriva H. et al. A comparative examination of neural circuit and brain patterning between the lamprey and amphioxus reveals the evolutionary origin of the vertebrate visual center // *J. Comp. Neurol.* 2015. V. 523. № 2. P. 251–261.
- Tahara Y. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski) // *Zoological Science*. 1988. V. 5. P. 109–118.
- Tao W., Lai E., Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain // *Neuron*. 1992. V. 8. № 5. P. 957–666.
- Toresson H., Martinez-Barbera J.P., Bardsley A. et al. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon // *Dev. Genes. Evol.* 1998. V. 208. P. 431–439.
- Ulmer B., Tingler M., Kurz S. et al. A novel role of the organizer gene Goosecoid as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43010.
- Zaraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L. et al. A novel homeobox gene expressed in the anterior neural plate of the *Xenopus* embryo // *Developmental Biology*. 1992. V. 152. P. 373–382.
- Zhao X.F., Suh C.S., Prat C.R. et al. Distinct expression of two foxg1 paralogues in zebrafish // *Gene. Expr. Patterns*. 2009. V. 9. № 5. P. 266–272.
- Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Ерошкин Ф.М. и др. Гомеобоксный ген семейства Anf, обнаруженный у тихоокеанской миноги *Lethenteron camtschaticum*, подтверждает гипотезу о важности появления генов *Anf* для возникновения конечного мозга в эволюции позвоночных // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 4. С. 241–251.

## Heterochrony of the Expression of *Lanf* and *Foxg1* in Lamprey Confirms the Appearance of the Telencephalon as an Evolutionarily Young Superstructure in the Central Nervous System of Vertebrates

G. V. Ermakova<sup>1</sup>, A. V. Kucheryavyu<sup>2</sup>, A. G. Zaraisky<sup>1</sup>, and A. V. Bayramov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

<sup>2</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: andrbayr@gmail.com

One of the most important evolutionary innovations of vertebrates is a complex structured telencephalon which provides higher forms of nervous activity in animals and humans. This work is devoted to the study of the appearance of the telencephalon in the early stages of vertebrate evolution. At the same time, there is reason to believe that lampreys, due to their evolutionary antiquity, could retain some ancient expression patterns of genes that regulate the development of the brain in the very first vertebrates. The study of the features of spatio-temporal expression patterns of key genes that regulate the development of the forebrain in lampreys compared with other vertebrates can help to understand the molecular mechanisms underlying the appearance and evolutionary development of this unique structure of vertebrates. This article presents the results of analysis of the dynamics of gene expression of *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* and *HoxB9* in the early stages of development of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis*. It was shown that lamprey genes involved in telencephalon differentiation (*Lanf* and *FoxG1*) exhibit heterochrony of expression compared with more evolutionarily advanced representatives of vertebrates. This fact confirms the idea that the telencephalon, being the most evolutionarily young part of the brain, could appear in vertebrate ancestors as a superstructure in the late stages of their embryonic development.

**Keywords:** *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid*, *HoxB9*, cyclostomates, *Lampetra fluviatilis*, telencephalon development, heterochrony

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 57.017.73:57.034:57.036:591.3:594.381.5

ЭНДОГЕННЫЕ БИОРИТМЫ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ  
КИСЛОРОДА В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ  
*PLANORBARIUS CORNEUS* (PLANORBIDAE, GASTROPODA)

© 2020 г. А. А. Зотин\*

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

\*e-mail: aazotin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2020 г.

После доработки 20.03.2020 г.

Принята к публикации 24.03.2020 г.

Два эндогенных биоритма интенсивности потребления кислорода с периодами 10.8 и 4.7 нед. выявлено в позднем постларвальном онтогенезе пресноводных брюхоногих моллюсков *Planorbarius corneus* с помощью сингулярного спектрального анализа. Локальные экстремумы обоих биоритмов у разных особей приходятся на одни и те же возраста, а их периоды приблизительно одинаковы у всех исследованных животных и остаются неизменными на протяжении индивидуального развития. Оба биоритма затухающие и имеют сходную амплитуду, которая уменьшается от примерно 1.1 мкл  $O_2$ /(ч г) в возрасте до 20 нед. до 0.26 мкл  $O_2$ /(ч г) к моменту гибели. Таким образом, выявлены новые, не описанные ранее эндогенные биоритмы, связанные со скоростью метаболизма.

**Ключевые слова:** интенсивность потребления кислорода, онтогенез, биоритмы, брюхоногие моллюски, *Gastropoda*, *Planorbarius corneus*

**DOI:** 10.31857/S0475145020040096

## ВВЕДЕНИЕ

Энергетический обмен, как и большинство процессов, происходящих в онтогенезе животных, обладает определенными ритмами. Подобные ритмы составляют основу жизнедеятельности организмов, являются скорее правилом, чем исключением, и, по-видимому, тесно связаны с механизмами регуляции биологических процессов посредством изменения длительности периодов и амплитуды колебаний (Мина, Клевезаль, 1976; Браун, 1977; Бродский, Нечаева, 1988; Зотин А.И., 1988). Данные о ритмах энергетического обмена суммированы в монографии А.И. Зотина (1988).

Наиболее многочисленны сведения по циркадным и сезонным колебаниям основного и стандартного обмена (Строганов, 1962; Беркович, 1964; Dmi'el, 1969; Dawson, Hudson, 1970; Brett, 1972; Chiba et al., 1973; Palmer, 1974; Kinnear, Shield, 1975; Bennett, Dawson, 1976; McCormick, 1981; Пантелеев, 1983; Way, Wissing, 1984; Ляшенко, Харченко, 1989). Циркадные и сезонные ритмы интенсивности потребления кислорода, скорее всего, определяются внешними причинами и приспособлением организмов к специфическим условиям существования жизни на Земле.

Животные, однако, имеют и строго эндогенные ритмы дыхания. Наиболее известны эндо-

генные ритмы энергетического обмена, связанные с линьками у членистоногих и ряда других животных (Клейменов, 1997). Эндогенные ритмы потребления кислорода с периодом 0.5–3.0 ч были установлены у ряда живых объектов. Например, у дробящихся яйцеклеток (Zeuthen, 1960; Зотин А.И., 1966), в делящихся синхронизированных культурах амёб (Edwards, Lloyd, 1978), у взрослых ракообразных (Brown et al., 1954; Palmer, 1974), млекопитающих (Kayser, Hildwein, 1974; Stupfel et al., 1979) и человека (Horne, Whitehead, 1976).

Ранее нами были выявлены эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в позднем постларвальном онтогенезе у пресноводных брюхоногих моллюсков *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae) (Зотин А.А., Клейменов, 2013).

Данная работа посвящена анализу эндогенных биоритмов интенсивности энергетического обмена в позднем постларвальном онтогенезе другого вида брюхоногих моллюсков – *Planorbarius corneus*, принадлежащих к другому семейству Planorbidae.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моллюсков *P. corneus* L. (Gastropoda, Planorbidae) получали путем разведения в лабораторных условиях. Вылупившихся 30.09.2016 г. моллюсков

содержали в стандартных условиях: в отстоянной (не менее 2 сут) водопроводной воде в термостате при постоянной температуре 20°C поодиночке в пластиковых стаканах объемом 50 мл. Корм (лист одуванчика *Taraxacum officinale* Wigg) добавляли в избытке, то есть в таком количестве, которое моллюск не успевал потребить до замены корма на свежую порцию.

Скорость потребления кислорода измеряли с помощью оксиметра Orion Star A223 RDO/DO portable meter (“Thermo Fisher Scientific”, USA), как это описано в предыдущей статье (Зотин А.А., Кирик, 2017). Животных помещали в закрытые сосуды и инкубировали в течение 3 ч. Измерения количества кислорода в воде проводили до и после инкубации. Скорость потребления кислорода  $P$  за единицу времени  $t$  определяли по формуле:

$$P = ((a_0 - a_1) - (c_0 - c_1))/t,$$

где  $a_0$  и  $a_1$  — количество кислорода в воде до и после инкубации моллюсков соответственно;  $c_0$  и  $c_1$  — аналогичные значения в контрольных сосудах (только с водой без животных).

Для всех животных измерение скорости потребления кислорода проводили в один и тот же день в произвольном порядке с интервалом между измерениями, не превышающим 2 ч. Измерения проводили 2 раза в неделю (по понедельникам и четвергам), начиная с 3 нед. после вылупления вплоть до естественной гибели животных. После чего животных помещали в свежую воду со свежей порцией корма.

Всего исследовано 9 животных.

Общую массу тела моллюсков определяли на весах Scout Pro (Швейцария) с точностью 1 мг. Интенсивность потребления кислорода рассчитывали путем деления величины скорости потребления кислорода одной особью на массу этой особи.

Анализ полученных данных проводили с использованием метода сингулярного спектрального анализа с помощью программы “Гусеница” (версия 3.40, разработана компанией GistaT Group, Россия). Каждый временной ряд разлагали на компоненты в соответствии с формулой (Главные..., 1997; Крынев, Лукин, 2010):

$$F(t) = T(t) + \sum W(t) + N(t), \quad (1)$$

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

Следует отметить, что программа “Гусеница”, использованная для вычленения основного тренда и биоритмов, работает только с временными рядами, то есть с рядами, в которых последовательные интервалы между измерениями времени постоянны. Поскольку измерения проводили с неравными временными интервалами, чередуя три и четыре сут, построение временного ряда на основе первичных данных оказалось невозможным. Поэтому первичные данные для каждого моллюска сглаживали с помощью кубических сплайнов с использованием программы Matlab (версия 7.3.0.267, разработана компанией The MathWorks, Inc., США). При этом мощность сглаживания выбирали по умолчанию (опция “Default”). На основании проведенного сглаживания с помощью той же программы строили временной ряд с интервалом 0.5 нед. Одновременно при этом достигалось частичное удаление случайных шумов. Построение временного ряда программным способом на основе сглаженной кривой дает вполне приемлемые результаты, если учесть, что ошибка, которую дает использованный программный метод, сопоставима с ошибкой измерения скорости потребления кислорода. Относительная ошибка, получаемая при смещении времени измерения в связи с построением временного ряда, не зависит от возраста моллюска, примерно равна относительной ошибке измерения скорости потребления кислорода и равна 2% (Thermo..., 2020). Исследование величины шумовых колебаний не входило в задачу работы.

При применении программы была выбрана опция “без центрирования”. Выбор опции “длина гусеницы” (“длина окна”) осуществляли следующим образом. Длину окна варьировали от 4 до 28 (половина количества измерений для моллюска с наименьшей продолжительностью жизни) и выбирали вариант, для которого основной тренд и ритмы разделялись наиболее отчетливо. В результате была выбрана длина окна равная 22.

Анализ основного тренда и волновых компонент проводили для каждой особи *P. corneus* индивидуально.

Период колебаний вычисляли как удвоенную разницу между значениями возрастов текущего и следующего локальных экстремумов. Амплитуду колебаний вычисляли как половину разницы между значениями интенсивности потребления кислорода в текущем локальном максимуме и следующем локальном минимуме.

“Шумовой” составляющей, связанной со случайными колебаниями измеренных параметров, считали ритмы с периодом меньше, чем промежуток между измерениями, умноженный на 4, то есть 2 нед.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наличие биоритмов, сопровождающих основной тренд становится очевидным уже при анализе кинетики интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *P. corneus* (рис. 1а).

Более подробный анализ с помощью сингулярного спектрального анализа показывает, что изменение интенсивности обмена для каждой особи может быть разложено на следующие составляющие: основной тренд, закономерные волновые составляющие и “шумовая” составляющая.

В качестве примера на рис. 1 приведено разложение на составляющие зависимости интенсивности потребления кислорода от возраста у одного из моллюсков.

Для всех исследованных особей основной тренд показывает постепенное снижение интенсивности потребления кислорода (рис. 1а). Изменение интенсивности обмена связано с основным трендом в наибольшей степени ( $92.3 \pm 1.9\%$ ).

Закономерные периодические изменения представлены двумя биоритмами (рис. 1б, 1в) со средними значениями периодов  $10.8 \pm 1.1$  и  $4.7 \pm 0.4$  нед. ( $n = 9$ ). Вклады биоритмов в изменчивость интенсивности обмена составляют  $4.0 \pm 1.1$  и  $3.5 \pm 2.1\%$  соответственно.

Изменение периодов и амплитуд биоритмов в онтогенезе каждой особи представлены в табл. 1. При анализе данных выявляется ряд закономерностей.

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

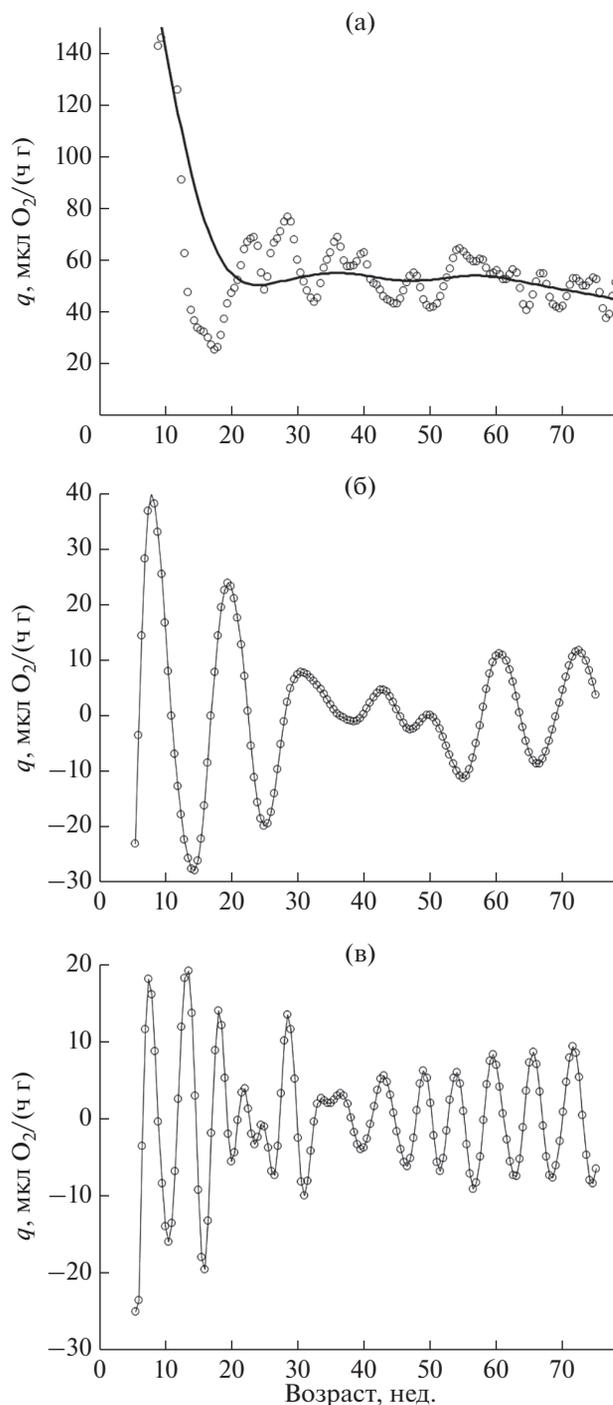
2. Периоды биоритмов на протяжении онтогенеза одной и той же особи остаются приблизительно постоянными.

3. Все биоритмы затухающие. Причем, наибольшая амплитуда колебаний приходится на первые 20 нед. развития. В дальнейшем она уменьшается, и в пределах чувствительности использованного метода ее можно считать постоянной вплоть до гибели животных.

4. Различия средних значений амплитуд для биоритмов с разными периодами не достоверны. Для моллюсков в возрасте до 20 нед. амплитуда в среднем равна  $1.1 \pm 0.3$ , для моллюсков в возрасте более 20 нед. —  $0.26 \pm 0.07$  мкл  $O_2$ /(ч г).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей статье (Зотин А.А., 2019) было проведено исследование основного тренда изменения интенсивности потребления кислорода у *P. corneus*. Было показано, что после вылупления наблюдается постепенное нарастание интенсивности энергетического обмена и к 3–8 нед.



**Рис. 1.** Разложение временного ряда интенсивности потребления кислорода (особь № 8). а — изменение интенсивности потребления кислорода: кружки — исходный временной ряд, линия — основной тренд; б — низкочастотная волновая составляющая (период около 10.8 нед.); в — высокочастотная волновая составляющая (период около 4.7 нед.).

постларвального развития у *P. corneus* достигается максимум. Затем наблюдается тенденция к непрерывному снижению интенсивности потре-

**Таблица 1.** Изменение индивидуальных параметров биоритмов интенсивности потребления кислорода в онтогенезе *P. corneus*

| № моллюска              | Параметр | $P_{\text{ср}}$<br>$\Delta A$ | Диапазон возрастов, нед. |       |       |       |        |         |
|-------------------------|----------|-------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|---------|
|                         |          |                               | 1–20                     | 21–40 | 41–60 | 61–80 | 81–100 | 101–120 |
| Низкочастотный биоритм  |          |                               |                          |       |       |       |        |         |
| 1                       | <i>P</i> | $9.8 \pm 0.4$                 | 9.3                      | 9.0   | 10.4  | 9.7   | 9.5    | 10.7    |
|                         | <i>A</i> | 0.55–0.35                     | 0.55                     | 0.34  | 0.33  | 0.18  | 0.31   | 0.35    |
| 2                       | <i>P</i> | $13.0 \pm 2.6$                | 13.0                     |       |       |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.60                          | 0.60                     |       |       |       |        |         |
| 3                       | <i>P</i> | $10.7 \pm 0.6$                | 9.5                      | 11.0  | 11.0  | 11.0  |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.55–0.16                     | 0.55                     | 0.11  | 0.19  | 0.16  |        |         |
| 4                       | <i>P</i> | $9.5 \pm 1.4$                 | 12.5                     | 10.0  | 7.7   | 9.0   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 2.09–0.16                     | 2.09                     | 0.13  | 0.19  | 0.16  |        |         |
| 5                       | <i>P</i> | $11.8 \pm 1.1$                | 13.0                     | 13.3  | 10.5  | 11.7  |        |         |
|                         | <i>A</i> | 2.14–0.09                     | 2.14                     | 0.30  | 0.14  | 0.09  |        |         |
| 6                       | <i>P</i> | $10.4 \pm 1.9$                | 10.3                     | 11.0  |       |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.77–0.78                     | 1.77                     | 0.78  |       |       |        |         |
| 7                       | <i>P</i> | $13.6 \pm 0.4$                | 13.0                     | 13.0  | 15.0  | 14.0  |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.18–0.10                     | 1.18                     | 0.56  | 0.57  | 0.10  |        |         |
| 8                       | <i>P</i> | $11.0 \pm 0.6$                | 11.3                     | 12.0  | 10.0  | 11.0  |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.56–0.46                     | 1.56                     | 0.56  | 0.18  | 0.46  |        |         |
| 9                       | <i>P</i> | $11.1 \pm 1.5$                | 11.0                     | 13.0  | 9.3   |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.14–0.32                     | 1.14                     | 0.71  | 0.32  |       |        |         |
| Высокочастотный биоритм |          |                               |                          |       |       |       |        |         |
| 1                       | <i>P</i> | $4.8 \pm 0.2$                 | 4.7                      | 6.0   | 4.6   | 4.8   | 4.3    | 4.4     |
|                         | <i>A</i> | 0.61–0.35                     | 0.61                     | 0.47  | 0.35  | 0.17  | 0.17   | 0.35    |
| 2                       | <i>P</i> | $4.5 \pm 0.3$                 | 4.4                      | 5.0   |       |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.49–0.18                     | 1.49                     | 0.18  |       |       |        |         |
| 3                       | <i>P</i> | $4.7 \pm 0.3$                 | 5.0                      | 4.4   | 5.1   | 4.3   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.63–0.18                     | 1.63                     | 0.42  | 0.26  | 0.18  |        |         |
| 4                       | <i>P</i> | $5.1 \pm 0.2$                 | 5.0                      | 5.0   | 5.8   | 4.7   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 1.41–0.09                     | 1.41                     | 0.31  | 0.26  | 0.09  |        |         |
| 5                       | <i>P</i> | $5.0 \pm 0.3$                 | 4.5                      | 5.5   | 5.1   | 4.9   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.68–0.21                     | 0.68                     | 0.37  | 0.17  | 0.21  |        |         |
| 6                       | <i>P</i> | $5.0 \pm 0.3$                 | 5.2                      | 5.3   |       |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.47–0.39                     | 0.47                     | 0.39  |       |       |        |         |
| 7                       | <i>P</i> | $4.7 \pm 0.2$                 | 4.7                      | 4.8   | 5.2   | 4.4   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.76–0.13                     | 0.76                     | 0.27  | 0.12  | 0.13  |        |         |
| 8                       | <i>P</i> | $5.3 \pm 0.2$                 | 5.0                      | 5.0   | 5.5   | 5.8   |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.74–0.33                     | 0.74                     | 0.28  | 0.38  | 0.33  |        |         |
| 9                       | <i>P</i> | $3.8 \pm 0.2$                 | 3.8                      | 3.5   | 4.1   |       |        |         |
|                         | <i>A</i> | 0.58–0.16                     | 0.58                     | 0.15  | 0.16  |       |        |         |

Примечания. *P*, нед. – период;  $P_{\text{ср}}$ , нед. – среднее значение периода для особи; *A* мкл  $O_2$ /(ч · г) – амплитуда;  $\Delta A$  – диапазон амплитуд. Пустая ячейка – моллюск к этому возрасту погиб.

ния кислорода вплоть до гибели моллюсков. Постоянное снижение интенсивности энергетического обмена характерно для взрослых животных (Зотин А.А., 2006, 2009, 2010).

В данной работе показано, что основная тенденция сопровождается закономерными колебательными процессами. Насколько такие ритмические процессы закономерны для разных видов животных остается неясным в связи с немногочисленностью работ, в которых выявлены эндогенные, не зависящие от среды ритмы энергетического обмена. Немногочисленность работ, по-видимому, объясняется, во-первых, трудоемкостью подобных исследований, во-вторых, отсутствием до недавнего времени компьютерных программ, позволяющих выявить и проанализировать биоритмы, в-третьих, невысокой точностью измерений, приводящих к тому, что случайный разброс чаще всего маскирует закономерные колебания.

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

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

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

Биологическое значение биоритмов для функционирования живых систем, по мнению многих авторов, связано с возможностью на их основе осуществлять регуляцию биологических процессов (Мина, Клевезаль, 1976; Бродский, Нечаева, 1988 и др.).

Причины колебаний не ясны. Мы полагаем, что обнаруженные колебания могут получить наиболее адекватное объяснение с позиций термодинамики необратимых процессов, которая рассматривает организмы как диссипативные структуры, т.е. определенным образом организованные стабильные структуры, характерной особенностью которых является повышенная по сравнению с окружающей средой диссипация энергии (Пригожин, 1960; Prigogine, Nicolis, 1967; Prigogine, 1972; Васильев, 1976; Зотин А.И., 1976; Лампрехт, 1976).

Формирование таких структур возможно только в открытых системах определенного уровня неравновесности. При этом диссипативные структуры находятся в так называемом неравновесном стационарном состоянии, в котором термодинамические потоки и силы не остаются строго постоянными, а колеблются вокруг некой величины

(Пригожин, 1960; Prigogine, Nicolis, 1967; Nicolis, 1972; Шахпаронов, Павленко, 1988).

В онтогенезе животных выделяют два вида стационарных состояний: текущее, в котором организм находится в настоящее время, и конечное, к которому организм стремится на протяжении всей жизни. Первое стационарное состояние можно связать с понятием “гомеостаз”, второе – с понятием “гомеорез” (Зотин А.И., 1988).

Таким образом, наличие двух ритмов интенсивности потребления кислорода находится в полном соответствии с выводами термодинамики нелинейных систем (Малек-Мансур и др., 1980) и свидетельствует в пользу гипотезы об эндогенной природе наблюдаемых биоритмов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Работа полностью выполнена одним автором А.А. Зотиным.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беркович Е.М.* Энергетический обмен в норме и патологии. М.: Медицина, 1964. 333 с.
- Браун Ф.* Биологические ритмы // Сравнительная физиология животных. Т. 2. М.: Мир, 1977. С. 210–260.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В.* Ритмы синтеза белка. М.: Наука, 1988. 240 с.
- Васильев В.А.* Стационарные диссипативные структуры // Термодинамика биологических процессов. М.: Наука, 1976. С. 186–198.
- Главные компоненты временных рядов: метод “Гусеница” / Под ред. Данилова Д.П., Жиглявского А.А. СПб: Изд-во СГПБУ, 1997. 308 с.
- Зотин А.А.* Уравнения, описывающие изменение массы и интенсивности дыхания в постэмбриональный период развития животных // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 4. С. 404–413.
- Зотин А.А.* Закономерности роста и энергетического обмена в онтогенезе моллюсков: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИБР РАН, 2009. 30 с.

- Зотин А.А. Энергетический обмен в индивидуальном развитии *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda). III. Поздний постличиночный онтогенез // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 695–703.
- Зотин А.А. Энергетический обмен в постличиночном онтогенезе *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda) // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 5. С. 306–311.
- Зотин А.А., Кирик Е.Ф. Скорость потребления кислорода в зародышевом развитии роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda) // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 295–300.
- Зотин А.А., Клейменов С.Ю. Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda) // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 6. С. 653–660.
- Зотин А.И. Изменение скорости продукции энтропии во время эмбрионального развития и роста // Биофизика. 1966. Т. 11. № 3. С. 554–557.
- Зотин А.И. Диссипативные структуры и  $\psi_u$ -функции // Термодинамика биологических процессов. М.: Наука, 1976. С. 203–205.
- Зотин А.И. Термодинамическая основа реакции организмов на внешние и внутренние факторы. М.: Наука, 1988. 272 с.
- Клейменов С.Ю. Энергетический обмен растущих личинок сверчка *Acheta domestica* L. по данным непрямой и прямой калориметрии // ДАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 690–692.
- Крянев А.В., Лукин Г.В. Метрический анализ и обработка данных. М.: Физматлит, 2010. 279 с.
- Лампрехт И. Диссипативные структуры в физике, химии и биологии // Термодинамика биологических процессов. М.: Наука, 1976. С. 175–186.
- Ляшенко А.В., Харченко Т.А. Годовая динамика энергетического обмена у дрейссены // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25. № 3. С. 31–38.
- Малек-Мансур М., Николис Г., Пригожин И. Неравновесные фазовые переходы в химических системах // Термодинамика и кинетика биологических процессов. М.: Наука, 1980. С. 59–83.
- Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.
- Пантелеев П.А. Биоэнергетика мелких млекопитающих. М.: Наука, 1983. 271 с.
- Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов. М.: ИЛ, 1960. 127 с.
- Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. М.: Изд-во МГУ, 1962. 444 с.
- Шахпаронов М.И., Павленко А.А. Неравновесная термодинамика и теория периодических процессов в макросистемах. II. Химические колебания вблизи состояния термодинамического равновесия // Журн. физ. химии. 1988. Т. 62. № 8. С. 2275–2278.
- Bennett A.F., Dawson W.R. Metabolism // Biology of Reptilia. N.Y.: Acad. Press, 1976. V. 5. P. 121–223.
- Brett J.R. The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates // Respirat. Physiol. 1972. V. 14. № 1/2. P. 151–170.
- Brown F.A., Bennett M.F., Webb H.M. Persistent daily and tidal rhythms of O<sub>2</sub>-consumption in fiddle crabs // J. Cell. Comp. Physiol. 1954. V. 44. № 3. P. 477–505.
- Chiba Y., Cutkomp L.K., Halberg F. Circadian oxygen consumption rhythm of the flour beetle, *Tribolium confusum* // J. Insect. Physiol. 1973. V. 19. № 11. P. 2163–2172.
- Dawson W.R., Hudson J.W. Birds // Comp. Physiol. of Thermoregulation. N.Y.: Acad. Press, 1970. V. 1. P. 224–310.
- Dmi'el R. Circadian rhythm of oxygen consumption in snake embryos // Life Sci. 1969. V. 8. № 24. P. 1333–1341.
- Edwards S.W., Lloyd D. Oscillations of respiration and adenine nucleotides in synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*: mitochondrial respiratory control in vivo // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 108. Pt 2. P. 197–204.
- Horne Y.A., Whitehead M. Ultradian and other rhythms in human respiration rate // Experientia. 1976. V. 32. № 9. P. 1165–1167.
- Kayser C., Hildwein G. Evolution de la consommation d'oxygène et de l'activité du cobaye au cours du nyctémère // Arch. Sci. Physiol. 1974. V. 28. № 1. P. 1–23.
- Kinnear A., Shield J.W. Metabolism and temperature regulation in marsupials // Comp. Biochem. Physiol. 1975. V. A52. № 1. P. 235–245.
- McCormick S.A. Oxygen consumption and torpor in the fat-tailed dwarf lemur (*Cheirogallus medius*): rethinking prosimian metabolism // Comp. Biochem. Physiol. 1981. V. A68. № 4. P. 605–610.
- Nicolis G. Fluctuations around non-equilibrium states in open non-linear systems // J. Stat. Phys. 1972. V. 6. № 2/3. P. 195–222.
- Palmer J.D. Biological Clocks in Marine Organisms. N.Y.: Wiley, 1974. 173 p.
- Prigogine I. La thermodynamique de la vie // La Recherche. 1972. V. 3. № 24. P. 547–562.
- Prigogine I., Nicolis G. On symmetry-breaking instabilities in dissipative systems // J. Chem. Phys. 1967. V. 46. № 9. P. 3542–3549.
- Stupfel M., Davergne M., Peramon A., Lemercerie C., Gourlet V. Rythmes ultradiens respiratoires de quatre petits vertébrés // C. R. Acad. Sci. D. 1979. V. 289. № 9. P. 675–678.
- Thermo Scientific™ Orion Star™ A223 Dissolved Oxygen Portable Meter. 2020. <https://www.fishersci.com/shop/products/orion-star-a223-dissolved-oxygen-portable-meter/p-4529337>.
- Way C.M., Wissing T. Seasonal variability in the respiration of the freshwater clams. *Pisidium variabile* (Prime) and *P. compressum* (Prime) (Bivalvia: Pisidiidae) // Comp. Biochem. Physiol. 1984. V. 78A. P. 453–457.
- Zeuthen E. Cyclic in oxygen consumption in cleaving eggs // Exp. Cell Res. 1960. V. 19. № 1. P. 1–16.

## Endogenous Biorhythms of Mass Specific Rate of Oxygen Consumption in Individual Development of *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda)

A. A. Zotin\*

*Koltsov Institute of Development Biology RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*\*e-mail: aazotin@mail.ru*

Two endogenous biorhythms of mass specific rate of oxygen consumption with periods of 10.8 and 4.7 weeks were detected in the late postlarval ontogenesis of freshwater gastropod mollusks *Planorbarius corneus* using a singular spectral analysis. The local extreme points of both biorhythms in different individuals fall at the same ages. Periods of both biorhythms are approximately the same in all the animals studied and remain unchanged throughout the individual development. Both biorhythms are fading and have a similar amplitude, which decreases from about 1.1  $\mu\text{L O}_2/(\text{h g})$  up to 20 weeks to 0.26  $\mu\text{L O}_2/(\text{h g})$  at the time of death. Thus, new, not previously described endogenous biorhythms associated with metabolic rate have been identified.

*Keywords:* oxygen consumption rate, ontogenesis, biorhythms, gastropods, Gastropoda, *Planorbarius corneus*

УДК 591.3

НАРУШЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ  
ПРИ СТАРЕНИИ МОГУТ БЫТЬ ИСПРАВЛЕНЫ

© 2020 г. В. Я. Бродский\*

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

\*e-mail: Brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 15.03.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

В кратком обзоре суммированы данные о возможности компенсации одного из нарушений биологии клеток при старении. В культурах гепатоцитов старых крыс, сравнительно с молодыми, снижены амплитуды ритма синтеза белка. Как и другие окологасовые (ультрадианные) ритмы *in vitro*, ритм синтеза белка является маркером синхронизации клеточной популяции путем прямых межклеточных взаимодействий. Амплитуды ритма характеризуют выраженность взаимодействий. Они увеличивались после добавления в среду культур ранее выявленных сигнальных факторов организации межклеточных взаимодействий: ганглиозидов, фенилэфрина, мелатонина, глутаминовой кислоты, регуляторных пептидов. К тому же приводило введение трех последних сигнальных факторов крысе *in vivo*. Эффект сохранялся 2–3 дня. Добавление к среде культур сыворотки крови молодой крысы увеличивало амплитуды ритма не меньше, чем сигнальные факторы. Сыворотка крови старой крысы не изменяла ритм. Но сыворотка крови старой крысы, обогащенная ганглиозидами, действовала как молодая сыворотка. Эти данные и сведения литературы позволяют предложить использование сигнальных факторов прямых межклеточных взаимодействий, для улучшения состояния старых людей.

**Ключевые слова:** межклеточные взаимодействия, старение, ультрадианные ритмы, синтез белка, ганглиозиды, катехоламины, мелатонин, глутаминовая кислота, регуляторные пептиды

**DOI:** 10.31857/S0475145020040023

Одно из давно известных нарушений метаболизма при старении млекопитающих – изменение обмена белков (Makrides, 1983; Rattan, 2009). Снижается интенсивность синтеза белков – от 20 до 80% в разных тканях. Кроме того, падает точность сборки молекул, накапливаются дефектные белки. Именно это приводит к развитию катаракты и нейродегенеративных болезней. В старости нарушается и катаболизм белков. Мы обнаружили еще одно следствие старения – нарушение кинетики окологасового (ультрадианного) ритма скорости синтеза белка (Brodsky et al., 2004).

Для того, чтобы стала понятна значимость нашего открытия, необходимо сначала рассказать о том, что такое ультрадианные ритмы и какую роль они играют в жизни разных организмов. Окологасовые (ультрадианные) ритмы – это ритмы с периодами от 20 до 120 минут. Они принципиально отличаются от суточного ритма многих процессов, миллионными лет вынужденно принятыми всеми формами жизни из-за регуляторной смены дня и ночи; суточные циклы регулируются у всех организмов на генетическом уровне. Для коротких ритмов такого внешнего датчика-орга-

низатора нет. Они отражают фундаментальную собственно клеточную регуляцию метаболизма на основе обратных связей, как пример фрактальной кинетики. Одно из свойств такой кинетики, замеченное нами, возможность клеток приспособиться к варьирующим внешним условиям путем прямых межклеточных взаимодействий. Окологасовые ритмы в клеточных культурах как раз характеризуют прямые межклеточные взаимодействия. Такие связи клеток, единственные у бактерий, протистов и растений дополняют центральные нервные регуляции у животных (Brodsky, 2006). В клеточных культурах обнаружение любого окологасового ритма характеризует кооперацию клеток. Иного способа согласования колебаний, их синхронизации в культуре нет. Любой окологасовой ритм в клеточной культуре можно использовать как маркер прямых взаимодействий клеток. Есть ритм, значит клетки согласуют свою активность, нет ритма – колебания разрозненны, не синхронны.

Величина размаха колебаний, амплитуд среднего ритма клеточной популяции *in vitro* соответствует синхронности популяции, величине кооперации клеток в организации ритма: чем амплитуды боль-

ше, тем больше клетки взаимодействуют. В несинхронной популяции среднего (суммарного) ритма нет: индивидуальные осцилляторы-клетки колеблются в противофазе.

Экспериментально показано, что клетки в культуре самосинхронизируются путем накопления в межклеточной среде некоторого фактора-синхронизатора, синтезируемого и выделяемого в среду самими клетками (Brodsky et al., 2000). Видимый результат — околочасовой ритм. В плотных культурах с небольшими промежутками между клетками ритм находят уже через несколько минут после смены среды на свежую бессывороточную. В редких культурах с большими промежутками между клетками ритм обнаруживают через несколько часов. На этом основана наша модель исследования механизмов прямых межклеточных взаимодействий: плотные и редкие культуры из клеток одной крысы. Очевидно, что выявление ритма в отмытых редких культурах после добавления к среде некоего фактора, определяет синхронизатор ритма. Если другой какой-то фактор ликвидирует ритм в плотных культурах, найден десинхронизатор ритма. Разумеется, при этом учитываются свойства рецепторов, воспринимающих синхронизирующий или десинхронизирующий сигнал. Так, среди семи семейств рецепторов серотонина два блокируют синхронизацию клеток, а пять стимулируют. Рецепторы одного семейства делают дофамин синхронизатором клеток, а связавшись с рецепторами другого семейства, тот же дофамин становится дезорганизатором ритма.

В организме млекопитающих с развитой и совершенной нервной системой значимость прямого общения клеток, казалось бы, ограничена или даже минимальна. Это не так. Во-первых, прямые взаимодействия остаются после денервации органа. Так ритм синтеза белка, маркера прямых межклеточных взаимодействий сохраняется в гепатоцитах после почти полной ваготомии и десимпатизации печени. Во-вторых, в раннем эмбриональном развитии задолго до становления нервной системы околочасовые метаболические ритмы сохраняются после торможения делений дробления и даже после энуклеации яйцеклетки, то есть прямые взаимодействия клеток являются базовыми в эмбриогенезе. И, третье, экспериментальное нарушение прямых взаимодействий клеток, приводит к их гибели.

Основной маркер наших работ — ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов крысы. Результаты подтверждены в исследованиях культур кератиноцитов, клеток окологлазной железы, мезенхимных стромальных клеток, некоторых нейронов. Совпадение с межклеточными взаимодействиями *in vivo* доказано введением синхронизаторов в кровь крысам. В лаборатории Д. Ллойда сходные закономерности обнаружены при изучении дыхания син-

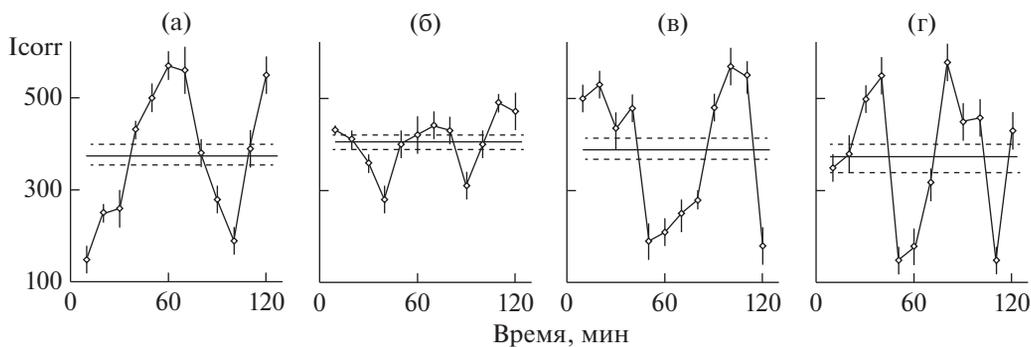
хронных и несинхронных культур дрожжей и амёб (Lloyd, 1998, 2007), в лаборатории Д. Гилберта и К. Хэммонд — в исследованиях ферментов фосфорилирования и дефосфорилирования белков (Hammond et al., 1998; Gilbert and Hammond, 2008).

Ритм синтеза белка обнаружили в плотных культурах гепатоцита крыс от рождения и до старости. Сильно различались амплитуды ритма у молодых и старых животных: в старости снижались примерно вдвое. Следовательно, при старении снижаются взаимодействия клеток, их кооперация в синхронизации индивидуальных колебаний интенсивности синтеза белка.

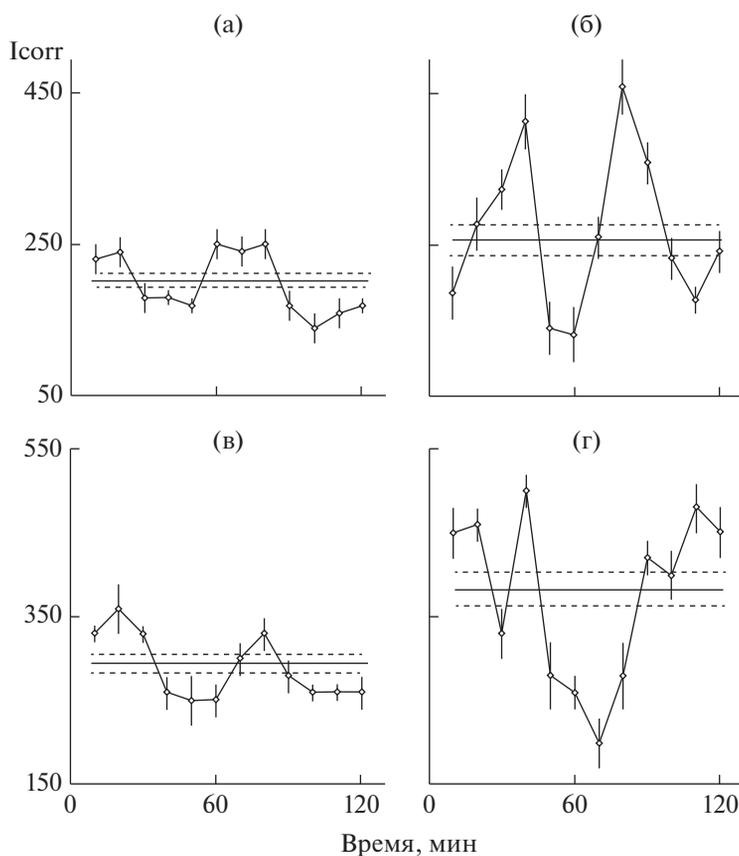
Введение в среду с плотными культурами гепатоцитов старых крыс синхронизаторов повышало амплитуды ритма до уровня молодых животных. На рис. 1 приведен пример. Видно, что амплитуды ритма синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов старой крысы (вес 610 г) значительно меньше, чем у молодой (280 г). Введение в среду с культурами этой старой крысы ганглиозидов или фенилэфрина вскоре (для фенилэфрина через 2 мин) повышало амплитуды ритма клеток старой крысы до уровня культур молодой крысы.

Таким же был результат влияния еще одного синхронизатора — мелатонина (рис. 2). Здесь приведен пример прямого действия мелатонина после введения его в культуральную среду (рис. 2а и 2б) и в опыте *in vivo* после инъекции мелатонина крысе. Еще один синхронизатор, глутаминовая кислота, также как мелатонин, проникая в клетку, как и он, действовал через свои специфические рецепторы (рис. 3). Из опытов *in vivo* следует, что синхронизатор, введенный в кровь (мелатонин) или поглощенный с пищей (глутаминовая кислота), то есть тоже через кровь, доходит до печени, синхронизирует там в течение 2 часов клетки (время постановки культур), и затем его эффект сохраняется еще сутки. Клетки помнят сигнал 2–4 дня.

Наши данные показали, что синхронизаторы ритма синтеза белка, влияя на прямые взаимодействия гепатоцитов, исправляют нарушения кинетики синтеза у старых животных. Гепатоциты — долго живущие клетки. После завершения интенсивных их делений вскоре после рождения крысы, гепатоциты слабо обновляются (один митоз на 10–20 тысяч клеток у взрослых). Без делений гепатоциты могут жить полгода или год, то есть четверть или половину жизни крысы. В старости могут произойти изменения состояния гепатоцитов. Известно, что в печени старых крыс и мышей значительно снижена концентрация ганглиозидов, как суммарных, так и моносиалоганглиозида — GM1 (Nakamura et al., 1993; Ozkok et al., 1999). GM1 — один из двух синхронизаторов гепатоцитов, из десятков содержащихся в печени (Brodsky et al., 2000). Изменения ганглиозидов в сыворотке



**Рис. 1.** Кинетика синтеза белка ( $I_{corr}$ , cpm) в плотных культурах молодой (280 г) или старой (610 г) крысы – (а) и (б). Действие на культуры старой крысы ганглиозидов (в) или фенилэфрина (г). Суточные культуры отмыты и перенесены в свежую бессывороточную среду, (а) и (б) или в среду с 0.3 мкМ ганглиозидов на 30 мин (в) или в среду с 2 мкМ фенилэфрина на 2 мин (г); затем все культуры опять отмыты и в них определена кинетика синтеза белка (по материалам Brodsky et al., 2004). Прямая линия – среднее для данного варианта опыта; пунктирные линии – ошибка этой средней.

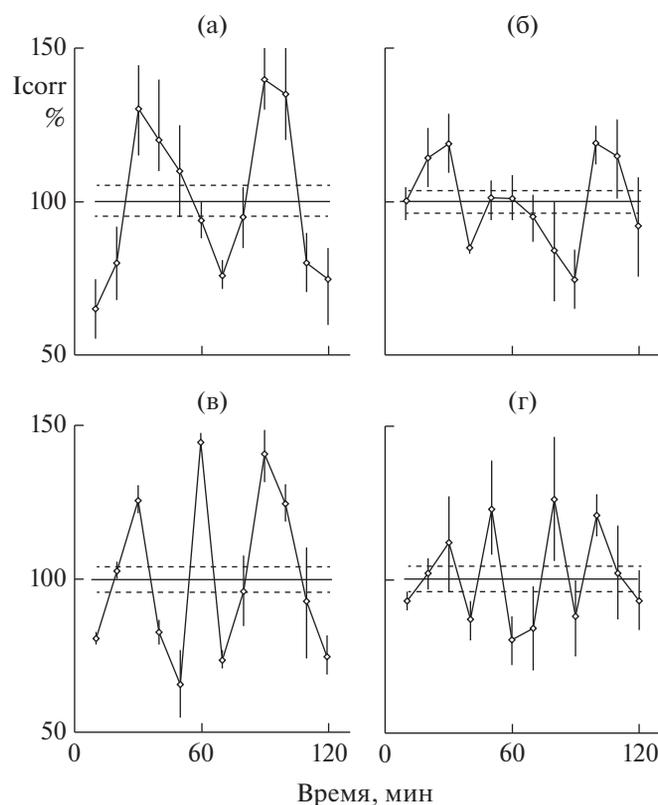


**Рис. 2.** Влияние мелатонина на кинетику синтеза белка в плотных культурах старых крыс: (а) суточные плотные культуры 2-год (570 г) крысы; (б) в среду с такими культурами этой крысы ввели 5 нМ мелатонина; (в) другой старой крысе (540 г) ввели физраствор и поставили плотные культуры; (г) третьей старой крысе (580 г) ввели 0.017 мкг/кг мелатонина и поставили такие культуры (по материалам Brodsky, Zvezdina, 2010).

крови известны (Senn et al., 1989; Bergelson, 1995). Значительно падает в крови старых крыс концентрация другого синхронизатора – норадrenalина (Прозоровская, 1983). Судя по нашим данным,

стареют не столько клетки, сколько межклеточная среда. И это можно исправить.

Вывод подтвердили в изучении влияния сыворотки крови, то есть межклеточной среды на ки-



**Рис. 3.** Действие глутаминовой кислоты на кинетику синтеза белка в плотных суточных культурах гепатоцитов молодой и старой крысы: (а) – культуры молодой крысы отмыты, перенесены в свежую нормальную среду и через 60 мин исследован синтез белка; (б) – такие же культуры старой крысы; (в) – в среду культур той же старой крысы добавлено 0.2 мг/мл глутаминовой кислоты; (г) – в среду добавили ингибитор рецепторов глутаминовой кислоты МСРГ (0.01 мг/мл) и затем 0.4 мг/мл глутаминовой кислоты на 60 мин. Включение лейцина с поправкой на пул Icorr выражено в процентах от среднего уровня (100%) для каждого варианта опыта. Пунктир – ошибка этой средней (Brodsky et al., 2018).

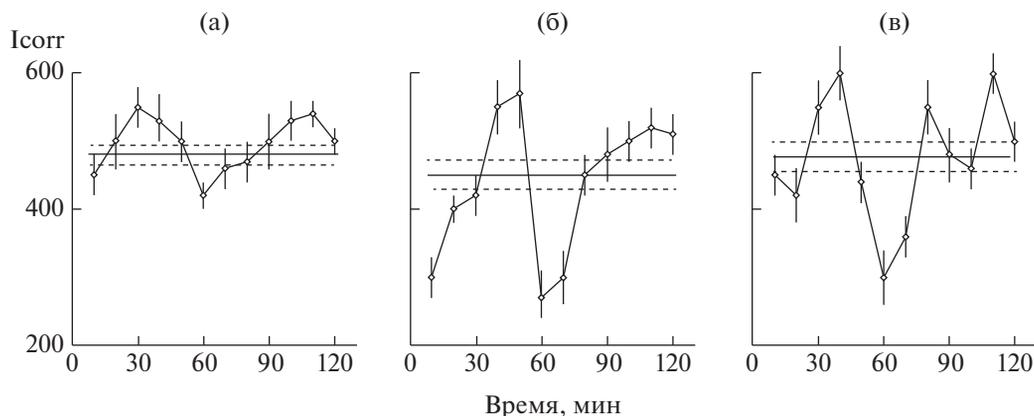
нетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс (рис. 4). 10 мин нахождения культур в среде с 10% сыворотки старых крыс не изменили кинетику синтеза белка сравнительно со средой без сыворотки. Сыворотка крови молодых крыс увеличила амплитуды колебаний примерно вдвое. Так же

подействовала старая сыворотка, к которой добавили ганглиозиды. Значит, в старой сыворотке не хватает синхронизаторов, в этом случае, ганглиозидов. По нашему показателю, прямым межклеточным взаимодействиям, старую сыворотку можно превратить в молодую.

**Таблица 1.** Амплитуды ритма синтеза белка у старых крыс в контроле и после введения синхронизатора

| Контроль        | Амплитуда (контроль)* | Синхронизатор        | Амплитуда (эксперимент)* |
|-----------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>In vitro</i> | 24 ± 2                | Фенилэфрин           | 62 ± 4                   |
| <i>In vitro</i> | То же                 | Ганглиозиды          | 46 ± 3                   |
| <i>In vitro</i> | 23 ± 2                | Мелатонин            | 65 ± 5                   |
| <i>In vitro</i> | 34 ± 2                | Глутаминовая кислота | 65 ± 4                   |
| <i>In vivo</i>  | 38 ± 3                | То же                | 68 ± 3                   |
| <i>In vitro</i> | 44 ± 3                | Пептид семакс        | 91 ± 8                   |
| <i>In vitro</i> | То же                 | Пептид HLDF-6        | 86 ± 7                   |
| <i>In vivo</i>  | 34 ± 2                | Семакс               | 77 ± 4                   |
| <i>In vivo</i>  | То же                 | HLDF-6               | 73 ± 4                   |

\* Амплитуды ритма синтеза белка выражены в % от среднего уровня для каждого варианта опыта, принятого за 100%.



**Рис. 4.** Влияние сыворотки крови на кинетику синтеза белка (прямые межклеточные взаимодействия) в плотных культурах старой крысы (вес 560 г): (а) — плотные культуры крысы (вес 580 г) отмыли и перенесли в среду с 10% сыворотки старых крыс; через 10 мин исследовали синтез белка; (б) — такие культуры перенесли в среду с 10% сыворотки молодых крыс и также через 10 мин исследовали синтез белка; (в) такие культуры перенесли в сыворотку старых крыс, обогащенную 0.3 мл ганглиозидов (по материалам Brodsky et al., 2004).

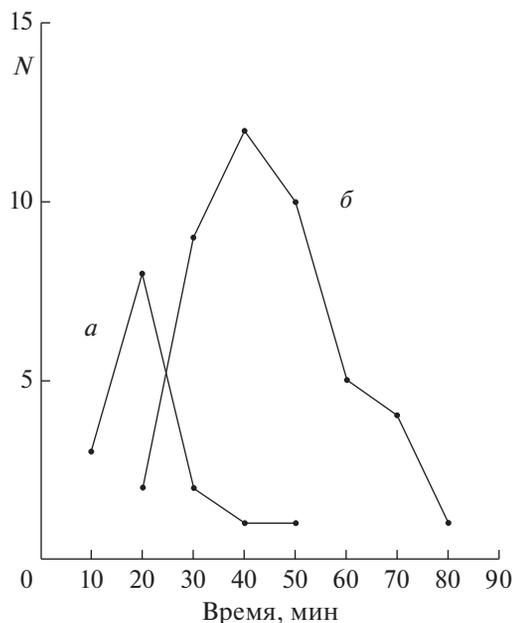
В серии опытов выясняли действие сыворотки на редкие культуры молодых крыс (Brodsky et al., 2004). В таких культурах, как уже отмечалось, после смены нормальной среды ритм не определяется несколько часов. Добавление в среду 10% сыворотки крови старых крыс привело к выявлению ритма, но его амплитуды были небольшими, что можно расценить как следствие малой концентрации синхронизирующих факторов в сыворотке старой крысы. Добавление в среду с редкими культурами сыворотки крови молодых крыс привело к обнаружению ритма с высокими амплитудами, такими как на рис. 4б и 4в.

В табл. 1 приведен материал более чем по 50 крысам (наши данные (2000–2020)). Главный вывод: прямые взаимодействия, нарушенные в старости, можно нормализовать, влияя на свойства межклеточной среды.

Независимо Д. Ллойд и др. (Murrey et al., 1999; Lloyd, Murrey, 2005; Lloyd, 2008) в опытах на дрожжах и амебах показали, что окологасовые ритмы этих одноклеточных организуются факторами среды, продуктами активности самих дрожжей. Принципиально важно, что уже найден организатор клеточных популяций дрожжей, общий с популяциями клеток млекопитающих. Нашли влияние серотонина на синхронный рост культур *Candida* (Страховская и др., 1993) и *Saccharomyces* (Цавкелова и др., 2000). Рост дрожжей подавлялся при добавлении к среде *n*-хлорофенилаланина, ингибитора синтеза серотонина и ускорялся парадизолом, ингибирующим моноаминоксидазу, фермент деградации моноаминов. Позже и в лаборатории Ллойда (Lloyd, Murrey, 2005) отмечена чувствительность популяции дрожжей к ингибиторам моноаминоксидазы; эти вещества предотвращают окисление биоаминов, включая

нейротрансмиттеры. В лаборатории А.В. Олескина (2009) фундаментально обосновано влияние серотонина, норадреналина на рост бактерий.

Уже в первых наших исследованиях обнаружили любопытный факт. Небольшая часть кривых кинетики синтеза белка в гепатоцитах молодых крыс имеет низкие амплитуды, а единичные кривые старых животных не отличаются от молодых (рис. 5). По нашему показателю — амплитудам, характеризующим выраженность прямых



**Рис. 5.** Вариабельность средних амплитуд кинетики синтеза белка (прямых межклеточных взаимодействий) у 15 старых (а) и 43 молодых (б) крыс (по данным работ лаборатории цитологии ИБР).

межклеточных взаимодействий, 10–15% молодых крыс (всего их здесь 43) соответствуют максимальным значениям у старых животных. Что, помимо, интереснее: две старые крысы из 15 изученных не отличались по межклеточным взаимодействиям от медиан молодых крыс.

Исправление кинетики синтеза белка путем прямых межклеточных взаимодействий — частный пример адаптивности фракталов, окологосового ритма синтеза белка, как их представителя. В данном случае клетки приспособляются к среде их обитания. В межклеточной среде стариков не хватает синхронизирующих факторов. Добавление в среду культур старых животных или в их кровь синхронизаторов ритма синтеза белка омолаживает клетки.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю профессора В.В. Терских за обсуждение и полезные замечания.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.* Сигнал глутаминовой кислоты синхронизирует кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс в течение нескольких дней. Память в метаболизме клеток // Биохимия. 2018. Т. 83. № 3. С. 429–435.
- Олескин А.В.* Нейрохимия и симбиотическая микрофлора человека // Вестник Российской Академии наук. 2009. Т. 79. № 5. С. 431–438.
- Прозоровская М.П.* Возрастные изменения адреналина и норадреналина в тканях крысы // Физиол. журн. СССР. 1983. Т. 69. С. 1244–1246.
- Страховская М.Г., Иванова Э.В., Фрайкин Г.Я.* Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliesmondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* // Микробиология. Т. 62. № 1. С. 46–49.
- Цавкелова Е.А., Ботвинко И.Б., Кудрин В.С., Олескин А.В.* Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов // Доклады РАН. 2000. Т. 372. С. 840–842.
- Bergelson L.D.* Serum gangliosides as endogenous immunomodulators // Immunol. Today. 1995. V. 16. P. 483–486.
- Brodsky V.Y.* Direct cell–cell communication. A new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circadian) intracellular rhythms // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 2006. V. 82. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D.* Melatonin as the most effective organizer of the protein synthesis rhythm in hepatocytes *in vitro* and *in vivo* // Cell Biology Internat. 2010. V. 34. P. 1199–1204.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I.* Gangliodide-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biology International. 2000. V. 24. P. 211–222.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Malchenko L.A.* Small cooperative activity of old rat's hepatocytes may depend on composition of the intercellular medium // Cell Biology International. 2004. V. 28. P. 311–316.
- Brodsky V.Y., Malchenko L.A., Butorina N.N., Lazarev D.S., Zvezdina N.D., Dubovaya T.K.* Glutamic acid as enhancer of protein synthesis kinetics in hepatocytes from old rats // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. № 8. P. 957–961.
- Gilbert D.A., Hammond K.D.* Phosphorylation dynamics in mammalian cells // Ultradian Rhythms from Molecules to Mind / Eds. Lloyd D., Rossi E.L. Springer-Verlag, London. NY, 2008. P. 105–128.
- Hammond K.D., Bhoola R., Bodalina U., Gilbert D.A.* Dynamic cells: temporal organisation and control of phosphorylation // Trends Comparative Bioch. Physiol. 1998. № 4. P. 75–88.
- Lloyd D.* Circadian and ultradian clock-controlled rhythms in unicellular microorganisms // Adv. Microb. Physiol. 1998. V. 39. P. 291–338.
- Lloyd D.* Biological time is fractal: Early events reverberate over a life time // J. Biosci. 2008. V. 33. № 1. P. 9–19.
- Lloyd D., Murrey D.B.* Ultradian metronome: timekeeper for orchestration of cellular coherence // Trends in Biochemical Sciences. 2005. V. 30. № 7. P. 373–377.
- Makrides S.C.* Protein synthesis and degradation during aging and senescence // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 1983. V. 58. P. 343–422.
- Murray D.B., Engelen F., Lloyd D., Kuriyama H.* Involvement of glutathione in the regulation of respiratory oscillation during a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology. 1999. V. 145. P. 2739–2745.
- Nakamura Y., Hishimoto Y., Yamakawa T., Suzuki A.* Age-dependent changes in GM1 and GD1a expression in mouse liver // J. Biochem. 1988. V. 103. P. 396–398.
- Ozkok E., Cendiz S., Guevener B.* Age-dependent changes in liver ganglioside levels // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 10. P. 337–344.
- Rattan S.I.S.* Synthesis, modification and turnover of proteins during aging // Protein Metabolism and Homeostasis in Aging / Ed. Tavernarakis N. Landes Bioscience and Springer Science, 2009. P. 1–13.
- Senn H.J., Orth M., Fitzke E., Wieland H., Gerok W.* Gangliosides in normal human serum. Concentrations, pattern and transport by lipoproteins // Europ. J. Biochem. 1989. V. 81. P. 657–662.

## Cell-Cell Interaction Disorders Associated with the Senescence Can Be Repaired

V. Ya. Brodsky\*

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

*\*e-mail: Brodsky.idb@bk.ru*

This mini-review summarizes the data concerning the possibility of compensating for one of senescence disorders. In hepatocyte cultures of old rats, comparing with young ones, the ultradian protein synthesis rhythms were reduced in amplitudes. Like other ultradian rhythms detected *in vitro*, protein synthesis rhythm is a marker of cell population synchronization through direct intercellular interactions. Amplitudes of the rhythm characterize the intensity of interactions. The interactions were enhanced after adding to the culture medium previously identified signaling factors of cell-cell communication, such as gangliosides, phenylephrine, melatonin, glutamic acid, some regulatory peptides. The same occurred after addition the factors *in vivo*. This effect lasted for 2–3 days. The addition of the blood serum of young rats to the culture medium increased the amplitudes of protein synthesis rhythm as well. The blood serum of old rats did not change the rhythm amplitudes. However, the blood serum of old rats enriched with gangliosides enhanced the amplitudes as effective as a young rat serum. These data as well as some literature data allow to recommend the use of signaling factors of cell-cell communication for improving the condition of old people.

*Keywords:* cell-cell communication, senescence, ultradian rhythms, protein synthesis, gangliosides, catecholamines, melatonin, glutamic acid, regulatory peptides

УДК 578;57.085

## ТЕРАПИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ – СОСУД НАПОЛОВИНУ ПОЛОН ИЛИ НАПОЛОВИНУ ПУСТ?

© 2020 г. Ю. В. Суханов<sup>а, \*</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>а</sup>, И. В. Лядова<sup>а</sup>, А. В. Васильев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: yuri.sukhanov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.

После доработки 30.04.2020 г.

Принята к публикации 02.05.2020 г.

Актуальность скорейшего поиска и внедрения в медицинскую практику метода терапии особо тяжелых форм пневмонии COVID-19 обусловлена отсутствием эффективных методов лечения, уничтожающих возбудителя. Ожидания получить хороший клинический эффект от применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) не беспочвенны – имеется научное обоснование использования МСК в терапии воспалительных заболеваний, в том числе доказанные механизмы их действия. Наряду с этим, надежных данных о механизме действия МСК при их системном введении человеку крайне мало, так же, как и данных о распределении клеток в организме и отдаленных последствиях такого введения. Данные модельных экспериментов противоречивы как в отношении специфического действия МСК, так и их безопасности. Если клинические исследования покажут приемлемое соотношение риск/польза применения МСК, страны, где такие исследования проводились, могут рассчитывать на их внедрение в медицинскую практику. В России следует инициировать экспериментальную проверку наличия специфического действия МСК и риски их применения при COVID-19 в достаточном объеме, и параллельно создавать механизм ускоренного, но обоснованного допуска биомедицинских клеточных продуктов в практику.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, МСК, SARS-CoV-2, пневмония, COVID-19, воспаление, цитокины, клинические исследования, биомедицинские клеточные продукты

**DOI:** 10.31857/S0475145020040102

Среди множества проблем клеточных технологий самым актуальным остается вопрос клинического использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Эти клетки привлекают внимание в качестве наиболее доступного ресурса клеточных технологий, пригодных для решения многих медицинских задач. Многолетние усилия по трансдифференцировке МСК в другие типы клеток, в т.ч. нейральные, кроветворные, а также в гепатоциты, кардиомиоциты и клетки поджелудочной железы как и многие другие, не привели к ожидаемым результатам, однако попытки клинического применения МСК в качестве системного регулятора воспалительных и репаративных процессов продолжают.

В связи с этим не стали неожиданными попытки использовать МСК для лечения пациентов с тяжелой формой SARS-CoV-2. Актуальность скорейшего поиска и внедрения в медицинскую практику метода терапии особо тяжелых форм пневмонии COVID-19 обусловлена отсутствием таргетных методов лечения, уничтожающих возбудителя, а также особенностями пациентов, имеющих самый высокий риск смерти – это па-

циенты старшей возрастной группы, с осложнениями в виде иных заболеваний. Не следует забывать и о коммерческой мотивации стремления внедрить МСК в клиническую практику.

Ожидания получить клинический эффект от применения МСК не беспочвенны – есть научное обоснование использования МСК в противовоспалительной терапии, в том числе доказанные механизмы их действия.

Одной из основных характеристик МСК является их иммуномодулирующая/иммунорегуляторная активность, которая обеспечивается как прямыми межклеточными контактами, так и паракринно, за счет экспрессии на МСК и секреции ими большого количества молекул, обладающих иммуномодуляторными свойствами (Lyadova et al., 2016; Jiang, Xu, 2020). К таким молекулам относятся цитокины TGF-β, IL-10, ферменты индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), аргиназа-1 (Arg1), индуцибельная NO-синтаза (NOS2), простагландин E2 (PGE2), неклассические молекулы главного комплекса гистосовместимости I типа (HLA-G2), молекулы CD39 и CD73 (экспрессируются на МСК и совместно обеспечивают расщепление АТФ до аде-

нозина, обладающего иммуносупрессорной активностью), галектины (Gal-1 Gal-9). Эти факторы ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов и НК-клеток, образование и активность Т-хелперов 1 типа (Th1), продукцию ими IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , созревание и антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и макрофагов, продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL5, IL-8). За счет образования антагониста CCL2 МСК могут также ингибировать миграцию провоспалительных CCR2+ моноцитов в очаг воспаления. При этом МСК стимулируют образование Т-хелперов 2 типа (Th2) и регуляторных популяций Т- и В-лимфоцитов (Treg и Breg соответственно). Перечисленные свойства МСК обуславливают их противовоспалительную активность, которая потенцируется в “воспалительном” микроокружении, в частности, в присутствии IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , что позволяет рассматривать МСК не как иммуносупрессорную, а как иммунорегулирующую популяцию клеток (Lyadova et al., 2016; Jiang, Xu, 2020).

Наличие у МСК противовоспалительной активности подтверждается многочисленными исследованиями *in vivo*. В моделях экспериментального сепсиса внутривенное введение МСК, полученных из различных источников (костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови) снижало уровень провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6, стимулировало продукцию IL-10 макрофагами, уменьшало тяжесть сепсиса и смертность животных от него (Németh et al., 2002; Ahn et al., 2020). В модели эмфиземы легких у мышей терапия МСК костного мозга человека и кондиционированная МСК среда оказывали существенное цитопротективное действие при раннем применении (Kennelly et al., 2016). Эти защитные эффекты были обусловлены значительными противовоспалительными, антифиброзными и антиапоптотическими свойствами.

В то же время в исследованиях на животных встречаются указания на возможную недостаточную эффективность и возможные побочные эффекты при введении МСК. Так, в модели сепсиса на свиньях введение МСК не выявило сколь-нибудь значимых положительных эффектов (Hogak et al., 2020), не уменьшало гемодинамические изменения и развитие полиорганной недостаточности, вызванных сепсисом. У мышей в условиях выраженного воспалительного процесса в легочной ткани, вызванного инфекцией *M. tuberculosis*, МСК не обеспечивали эффективного снижения воспалительного процесса (Nenasheva et al., 2017).

Побочные эффекты от введения МСК связаны, прежде всего, с их прокоагулянтной активностью и риском возникновения тромбозов, обусловленными продукцией тканевого фактора и, возможно, активацией системы комплемента (подробно рас-

сматривается в обзоре Coppin и соавт. (Coppin et al., 2017). В экстраклеточных секретлируемых везикулах, полученных от МСК, выявлено присутствие тканевого фактора (TF) и других белков, вовлеченных в систему коагуляции крови. Кроме того, обнаружено, что некоторые МСК и их везикулы содержали аннексин V, что подразумевает присутствие фосфатидилсерина на их поверхностях, усиливающее образование сгустка крови (Silachev et al., 2019). При системном введении здоровым животным МСК могут вызвать блокаду капиллярного русла легочной ткани и, помимо снижения продукции провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ), индуцировать повышение локального уровня хемокинов (CCL3, CCL4, RANTES) (Nenasheva et al., 2017).

Еще одним важным моментом является то, что вызываемое МСК снижение воспалительного ответа сопровождается ингибированием иммунных реакций, ответственных за защитные функции организма, в частности, за развитие противовирусного и противобактериального ответов (ингибирование образования и активности Th1, НК-клеток). В связи с этим применение МСК в условиях инфекционной патологии представляется невозможным без четкого определения иммунологических критериев целесообразности их применения (“окон возможностей”).

Результаты клинических исследований МСК также весьма противоречивы (Gomez-Salazar et al., 2010) и зачастую не достигают поставленных целей. Наиболее разработанным является применение МСК для смягчения рефрактерной к стероидам тяжелой реакции “трансплантат против хозяина”. Однако, например, на III фазе клинических исследований было продемонстрировано отсутствие значимого клинического эффекта препарата МСК Prochymal<sup>TM</sup>. Этот препарат, тем не менее, был разрешен в некоторых странах для лечения этой патологии у детей, поскольку именно в этой группе пациентов была заметна значимая разница с группой плацебо. Проводятся исследования для оценки потенциала МСК для лечения диабета, патологий печени, почек и легких, сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, воспалительных, неврологических и аутоиммунных заболеваний (Squillaro et al., 2016). Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) также рассматривается в контексте возможного применения МСК (Han et al., 2019). Однако ОРДС является гетерогенным синдромом и на основании анализа данных клинических исследований делается вывод о наличии, по крайней мере, двух типов ОРДС, из которых только один характеризовался более высокими уровнями воспалительных биомаркеров в плазме (Calfée et al., 2014). Возможно, терапия МСК для таких пациентов с гипертрофическим типом ОРДС будет наиболее эффективной.

В экспериментальных моделях вирусного ОРДС эффект МСК также не был однозначным. Вызванное вирусом гриппа H1N1 повреждение легких у мышей не купировалось введением МСК (Gotts et al., 2014). Однако введение МСК заметно ослабляло травму альвеолярно-капиллярного барьера у мышей, зараженных H5N1, которые имеют высокий уровень воспаления, и повышало вероятность выживания животных (Chan et al., 2016). В клинических исследованиях введение аллогенных МСК из жировой ткани больным с ОРДС не оказало положительного клинического эффекта и не вызвало сколь-нибудь статистически значимых изменений в биохимических показателях крови, в частности, в уровнях IL-8 и IL-6 (Zheng et al., 2016).

Хотя пока нет результатов серьезных клинических исследований долговременных эффектов и соотношения риск/польза внутривенного введения МСК, по имеющейся информации, количество краткосрочных побочных эффектов и осложнений невелико. Среди краткосрочных осложнений обращают на себя внимание сообщения о риске тромбоза, вызванного терапией (Tatsumi et al., 2017). При введении здоровым людям липополисахарида, предварительное введение МСК в высокой дозе оказывало смешанное провоспалительное (повышенное высвобождение IL-8 и нуклеосом) и противовоспалительное действие (повышенное высвобождение IL-10 и TGF- $\beta$ ), а также увеличивало активацию системы коагуляции и снижало фибринолитическую активность крови (Perlee et al., 2018).

Пока нет ответа и на самый важный вопрос о возможной индукции трансплантированными МСК опухолевого роста за счет модификации опухолевой стромы (Direkze et al., 2004).

Таким образом, надежных данных о механизме действия МСК при системном введении человеку крайне мало, так же, как и данных о распределении клеток в организме и отдаленных последствиях такого введения, а данные модельных экспериментов противоречивы как в отношении специфического действия МСК, так и их безопасности.

Тем не менее, вскоре после начала развития пандемии SARS-Cov-2 были инициированы клинические исследования с использованием МСК для лечения тяжелых проявлений этой инфекции. Большая часть таких исследований начата в КНР, однако вскоре появились сообщения и из других стран, и их число постоянно растет (более чем в два раза за неделю).

В связи с этим нами была предпринята попытка оценить масштаб исследований возможного терапевтического эффекта МСК при COVID-19 человека на основе информации международной базы данных клинических исследований Clinical-

Trials.gov (<https://clinicaltrials.gov>) (табл. 1 в Приложении на сайте журнала “Онтогенез”). На момент написания статьи было официально зарегистрировано 29 клинических исследований биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) (включая 1 отмененное) с целью лечения осложнений COVID-19, а также одно исследование клеточных везикул. Из них 18 соответствуют критериям клинических исследований, в то время как остальные могут быть описаны термином “Клиническая апробация”. Кроме того, по имеющимся данным ряд клинических исследований проводится с регистрацией только в КНР (Golchin et al., 2020). В качестве источника для клеточного продукта чаще всего использованы клетки пупочного канатика, что, вероятно, объясняется доступностью и/или свойствами биоматериала.

Вероятно, отсутствие серьезных доказательств эффективности продуктов на основе живых клеток человека при COVID-19 не позволило их упомянуть в выпущенном 21 апреля 2020 года Руководстве по лечению COVID-19 (Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines) Национальных институтов здоровья США (NIH) как возможно перспективных. В Руководстве отмечается, что в настоящее время ни один препарат не является безопасным и эффективным для лечения COVID-19, а эмпирически подобранные и применяемые в настоящее время средства лечения оказывают незначительное сдерживающее действие на развитие симптомов пневмонии, в том числе легочной недостаточности, приводящей к летальному исходу. В Рекомендациях отмечается, что не существует одобренных FDA лекарств, специально предназначенных для лечения пациентов с COVID-19 и недостаточно данных для того, чтобы рекомендовать применение противовирусной или иммуномодулирующей терапии у пациентов с COVID-19 (Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines). Тем не менее, если клинические исследования покажут приемлемое соотношение риск/польза применения МСК, страны, где такие исследования проводились, могут рассчитывать на их внедрение в медицинскую практику, вероятно, не ранее чем через год.

В России, однако, действующее законодательство в области БМКП не предполагает не только каких-либо механизмов ускоренной, либо упрощенной регистрации БМКП (в отличие от многих зарубежных стран, где для таких случаев предусмотрены механизмы Fast Track (быстрый вариант) или условной регистрации), но и механизма ускоренного получения разрешения на проведение клинических исследований. Даже если специальный механизм для БМКП будет разработан и одобрен, критическим вопросом является проведение доказательных доклинических исследований и изготовление образцов для клинических исследований на лицензированном

согласно надлежащим правилам производстве БМКП.

Представляется крайне важным, с одной стороны, не пропустить шанс для медицины получить новый эффективный инструмент лечения неизлечимых обычными методами заболеваний (либо состояний с высокой фатальностью), а с другой – не допустить массового применения БМКП с неопределенным соотношением риск/польза. Сначала следует провести экспериментальную проверку наличия специфического действия МСК и риски их применения при COVID-19 в достаточном объеме и параллельно создавать механизм ускоренного, но обоснованного допуска БМКП в практику. В противном случае, выявление серьезных побочных эффектов может произойти через какое-то время и полностью дискредитировать БМКП.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Госзадания ИБР РАН № 0108-2019-0004. 2020 год.

#### 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.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица 1 (см. на сайте журнала “Онтогенез” <http://ontogenez.org/?show=content4>).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahn S.Y., Maeng Y.-S., Kim Y.R. et al.* In vivo monitoring of dynamic interaction between neutrophil and human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell in mouse liver during sepsis // *Stem Cell Research & Therapy*. 2020. V. 11. № 1. P. 44–59.
- Calfee C.S., Delucchi K., Parsons P.E. et al.* Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomized controlled trials // *Lancet Respir. Med.* 2014. V. 2. № 8. P. 611–620.
- Chan M.C., Kuok D.I., Leung C.Y. et al.* Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury *in vitro* and *in vivo* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. V. 113. № 13. P. 3621–3626.
- Coppin L., Sokal E., Stéphenne X.* Thrombogenic risk induced by intravascular mesenchymal stem cell therapy: Current status and future perspectives // *Cells*. 2019. V. 8. № 10. P. 1160.
- Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>.
- Direkze N.C., Hodivala-Dilke K., Jeffery R. et al.* Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 23. P. 8492–8495.
- Golchin A., Seyedjafari E., Ardehshiryajimi A.* Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: present or future // *Stem Cell Rev. Rep.* 2020. P. 1–7.
- Gomez-Salazar M., Gonzalez-Galofre Z.N., Casamitjana J. et al.* Five decades later, are mesenchymal stem cells still relevant? // *Front Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. № 148. P. 1–13.
- Gotts J.E., Abbott J., Matthay M.A.* Influenza causes prolonged disruption of the alveolar-capillary barrier in mice unresponsive to mesenchymal stem cell therapy // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2014. V. 307. № 5. P. L395–L406.
- Han J., Li Y., Li Y.* Strategies to enhance mesenchymal stem cell-based therapies for acute respiratory distress syndrome // *Stem Cells Int.* 2019. № 5432134. P. 1–12. <https://clinicaltrials.gov>.
- Horak J., Nalos L., Martinkova V. et al.* Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study // *Front Immunol.* 2020. V. 11. № 126. P. 1–13.
- Jiang W., Xu J.* Immune modulation by mesenchymal stem cells // *Cell Prolif.* 2020. V. 53. P. e12712.
- Kennelly H., Mahon B., English K.* Human mesenchymal stromal cells exert HGF dependent cytoprotective effects in a human relevant pre-clinical model of COPD // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 38207. P. 1–11.
- Lyadova I.V., Sosunova E., Nikolaev A.V. et al.* Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: Common traits in immune regulation // *J. Immunol. Res.* 2016. 2016: 7121580.
- Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S. et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production // *Nat. Med.* 2009. V. 15. № 1. P. 42–49.
- Nenasheva T., Nikolaev A., Diykanov D. et al.* The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and *M. tuberculosis* infected mice // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 6. e0178983.
- Perlee D., van Vught L.A., Scicluna B.P. et al.* Intravenous infusion of human adipose mesenchymal stem cells modifies the host response to lipopolysaccharide in humans: a randomized, single-blind, parallel group, placebo controlled trial // *Stem Cells*. 2018. V. 36. № 11. P. 1778–1788.
- Silachev D.N., Goryunov K.V., Shpilyuk M.A. et al.* Effect of MSCs and MSC-derived extracellular vesicles on human blood coagulation // *Cells*. 2019. V. 8. № 258. P. 1–23.
- Squillaro T., Peluso G., Galderisi U. et al.* Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update // *Cell Transplant.* 2016. V. 25. № 5. P. 829–848.
- Tatsumi K., Ohashi K., Matsubara Y. et al.* Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 431. № 2. P. 203–209.
- Zheng G., Huang L., Tong H. et al.* Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study // *Respir. Res.* 2014. V. 15. № 39. P. 1–10.

## **News and Views Mesenchymal Stem Cells Therapy – Is a Glass Half Full or Half Empty?**

**Yu. V. Sukhanov<sup>1,\*</sup>, E. A. Vorotelyak<sup>1</sup>, I. V. Lyadova<sup>1</sup>, and A. V. Vasiliev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Development Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*\*e-mail: yuri.sukhanov@gmail.com*

The relevance of the speedy search and implementation to the medical practice new methods of severe forms of pneumonia COVID-19 treatment is to the lack of effective methods that destroy the pathogen. Expectations for a good clinical effect of use MSCs are not unfounded – there is a scientific justification for the use of MSCs, including proven mechanisms of their action. Reliable data on the mechanism of action of MSCs during systemic administration to humans are extremely scarce, as well as the data on the distribution of cells in the body and the long-term consequences of the administration. The data of model experiments are contradictory both with respect to the specific action of MSCs and its safety. If clinical trials show an acceptable risk/benefit ratio for the use of MSCs, countries where such studies have been conducted can count on their introduction into medical practice. In Russia, an experimental verification of the presence of a specific action of MSCs and the risks of their use with COVID-19 in sufficient quantities should be initiated, and in parallel, a mechanism should be established for the accelerated but substantiated admission of cell products.

*Keywords:* mesenchymal stem cells, MSCs, SARS-CoV-2, pneumonia, COVID-19, inflammation, cytokines, clinical trials, biomedical cell products