

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 52, номер 4, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

- Цитофизиологические особенности экспериментальной системы  
“зародыш *in vivo* – каллус *in vitro*” хлебных злаков  
*Н. Н. Круглова, Г. Е. Титова, О. А. Сельдимирова, А. Е. Зинатуллина* 237
- Проблема дифференцировки и апоптоза при криохранении  
кератиноцитов человека в суспензии  
*А. Н. Попова, Е. А. Воротеляк* 254
- Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального  
пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих *in vivo*  
*Э. Н. Григорян, Ю. В. Маркитантова* 260
- 

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

- Проявление биоморфологических и анатомических особенностей в ходе  
онтогенеза мышехвостника маленького *Myosurus minimus* L. (Ranunculaceae)  
*М. В. Марков* 287
- 

## МЕТОДЫ И МОДЕЛИ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

- Вольвокс как модель для изучения гибели клеток и старения  
*А. Г. Десницкий* 295
- 

## МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

- Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки  
ретинального пигментного эпителия  
*А. В. Кузнецова, Л. А. Ржанова, М. А. Александрова* 305
- 
-

# Contents

---

---

Vol. 52, No. 4, 2021

---

---

## REVIEWS

- Cytophysiological Features of the Experimental System  
“Embryo *in vivo* – Callus *in vitro*” of Cereals  
*N. N. Kruglova, G. E. Titova, O. A. Seldimirova, and A. E. Zinatullina* 237
- Problem of Terminal Differentiation and Apoptosis during Human  
Keratinocytes Cryostorage in Suspension  
*A. N. Popova and E. A. Vorotelyak* 254
- Molecular Strategies for Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells  
in Amphibians and Mammals *in vivo*  
*E. N. Grigoryan and Yu. V. Markitantova* 260
- 

## DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

- Biomorphological and Anatomical Features Manifested in the Course of Development  
(Ontogenesis) in the Mousetail *Myosurus minimus* L. (Ranunculaceae)  
*M. V. Markov* 287
- 

## METHODS AND MODELS OF BIOLOGY DEVELOPMENT

- Volvox* as a Model for Studying Cell Death and Senescence  
*A. G. Desnitskiy* 295
- 

## MECHANISMS OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

- Small Non-Coding RNA in Regulation of Differentiation of Retinal Pigment Epithelium  
*A. V. Kuznetsova, L. A. Rzhanova, and M. A. Aleksandrova* 305
- 
-

УДК 58.085:581.143.6:581.3

## ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ “ЗАРОДЫШ *IN VIVO* – КАЛЛУС *IN VITRO*” ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

© 2021 г. Н. Н. Круглова<sup>а, \*</sup>, Г. Е. Титова<sup>б</sup>, О. А. Сельдимирова<sup>а</sup>, А. Е. Зинатуллина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

<sup>б</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: [kruglova@anrb.ru](mailto:kruglova@anrb.ru)

Поступила в редакцию 16.02.2021 г.

После доработки 05.03.2021 г.

Принята к публикации 09.03.2021 г.

Важнейшая проблема в исследовании каллусов растений *in vitro* – взаимоотношение эндогенных и экзогенных факторов, влияющих на формирование каллусов (“каллусообразование”) и их развитие на индукционной среде (“каллусогенез”). Особый интерес вызывает такой эндогенный фактор, как цитофизиологический статус эксплантов *in vivo* и каллусов в динамике культивирования *in vitro*. В обзоре на примере хлебных злаков проведен анализ литературных и собственных данных по выявлению гистологических и гормональных особенностей инициальных клеток каллусов в эксплантах – незрелых зародышах *in vivo*, а также формирующихся из них морфогенных каллусов в ходе развития *in vitro*. Рассмотрены представленные в литературе ответы на некоторые дискуссионные вопросы, связанные с индуцированием морфогенетической компетентности и репрограммирования развития инициальных клеток каллусов. Проведенное сравнение каллусообразования и каллусогенеза *in vitro* с некоторыми аналогичными событиями *in vivo* подтверждает правомочность принципа универсальности процессов морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014 и ранее). Обсуждается перспективность использования единой (интегрированной) экспериментальной системы “зародыш *in vivo* – каллус *in vitro*” в качестве модели для изучения сложнейшего биологического феномена – морфогенеза растений.

**Ключевые слова:** зародыш *in vivo*, каллус *in vitro*, цитофизиология, морфогенез растений, хлебные злаки

**DOI:** 10.31857/S0475145021040042

### ВВЕДЕНИЕ

Первые работы, посвященные получению каллуса из изолированных участков мезофилла листа и изучению каллусогенеза *in vitro*, появились еще в конце XIX–начале XX вв. (по: Ikeuchi et al., 2013; Sugiyama, 2015; Kruglova et al., 2018a), однако однозначной дефиниции этой структуры не предложено. Наиболее детальное определение приведено в работе Т.Б. Батыгиной (2014): каллус – интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине этих тканей); изначально состоит из однородных клеток, которые постепенно преобразуются в систему групп гетерогенных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза (добавим: при этом некоторые пути морфогенеза в условиях *in vitro* приводят к формированию полноценных растений-регенерантов. – Авт.).

Предприняты попытки разработать периодизацию формирования и развития каллусов *in vitro*. В этих взаимосвязанных процессах выделяют, например, критические стадии (Kruglova et al., 2018a), фазы индукции и экспрессии (Yu et al., 2019). В целом же этот вопрос остается открытым. По-видимому, можно говорить о формировании каллусов (“каллусообразование”) и усложнении их структуры (“каллусогенез”) на индукционной среде *in vitro* и о развитии групп клеток каллусов по различным путям морфогенеза на регенерационной среде *in vitro*.

Разнообразие каллусов, полученных на индукционных средах *in vitro*, сводится к двум контрастным группам: способные и не способные к морфогенезу на регенерационных средах *in vitro*, иначе говоря – морфогенные и неморфогенные (подробнее: Зинатуллина, 2020). Однако кроме термина “морфогенный” в литературе по отношению к образовавшимся каллусам используются также термины “органогенный”, “эмбриогенный”, “регенерационный (регенерационно спо-

собный)” каллус, хотя при этом фактически речь идет о каллусе, в котором только в дальнейшем будут отмечены пути морфогенеза *in vitro*, в том числе приводящие к формированию регенерантов. На наш взгляд, употребление терминов “органогенный”, “эмбриогенный”, “регенерационный” по отношению к морфогенным каллусам методически не совсем корректно, поэтому в данной статье мы будем применять только термин “морфогенный каллус” (далее – каллус, если не оговорено специально).

Способность к образованию каллусов *in vitro* отмечена у эксплантов представителей многих семейств растений. Большой практический интерес в этом отношении вызывают злаки – коммерчески ценная группа растений, у которых с трудом и формируются каллусы *in vitro*, и регенерируют из них растения *in vitro* и *ex vitro*. Вопросы каллусообразования из различных эксплантов злаков и каллусогенеза на индукционных/регенерационных средах *in vitro* проанализированы авторами ранее в обзорной работе (Kruglova et al., 2018a). Однако стремительный рост публикаций в области биотехнологических аспектов использования каллусов злаков заставляет еще раз обратиться к этим вопросам. Важно, на наш взгляд, дать более широкую оценку незрелых зародышей злаков *in vivo* как перспективных эксплантов для получения каллусов *in vitro*, обратив особое внимание на цитофизиологический статус этих эксплантов во время инокуляции на индукционную среду *in vitro*. Этот статус, сопряженный с морфогенетической компетентностью клеток зародыша, отражает взаимодействие структурных (цитогистологических) и функциональных (физиологических, главным образом гормональных) свойств эксплантов. Кроме того, важно с таких же цитофизиологических позиций дать оценку и сформировавшемуся каллусу в динамике развития на индукционной среде *in vitro*. Методологическим подходом авторов данного обзора служит базовый принцип универсальности процессов морфогенеза в растениях *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014).

Цель данной обзорной статьи, являющейся продолжением публикаций авторов по различным проблемам исследования каллусообразования и каллусогенеза растений *in vitro*, – провести анализ литературных и собственных данных по цитофизиологическим особенностям незрелых зародышей злаков как эксплантов для получения каллусов, а также рассмотреть цитофизиологические аспекты инициации формирования зародышевых каллусов на индукционной среде *in vitro*, в сравнении с некоторыми аналогичными событиями *in vivo*.

## ИНИЦИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАЛЛУСОВ В НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШАХ ЗЛАКОВ

*Проблема морфогенетической компетентности клеток эксплантов in vivo как инициальных клеток каллусов in vitro*

Проблема компетентности клеток эксплантов к каллусообразованию *in vitro* была поставлена еще в самых ранних исследованиях этих процессов в работах Хаберландта, выдвинувшего гипотезу тотипотентности любой живой клетки (Haberlandt, 1902, по: Бутенко, 1999). Большое значение решению этой проблемы придается и в современных исследованиях, связанных с анализом различных аспектов регенерации растений в каллусных культурах *in vitro* (например, цикл обзорных работ Ikeuchi et al., 2013–2019).

К настоящему времени многочисленными исследованиями установлено, что в качестве эксплантов для получения каллусов возможно использование различных вегетативных, генеративных и эмбриональных структур. Клетки эксплантов в адекватных условиях *in vitro* проявляют компетентность к образованию не только разных типов тканей и органов (свойство плюрипотентности), но и нового организма за счет различных путей морфогенеза (свойство тотипотентности) (термины приведены по: Батыгина, 2014).

Успех в формировании каллусов определяется комплексом взаимосвязанных эндогенных и экзогенных факторов (обзоры: Ikeuchi et al., 2013; Gaillolchet, Lohmann, 2015; Sugiyama, 2015; Kruglova et al., 2018a; Rocha et al., 2018; Feher, 2019; Зинатуллина, 2020 и др.). С позиции терминологии в области биологии развития растений (по: Медведев, Шарова, 2014) эндогенные факторы формирования каллусов можно расценивать как присутствие в эксплантах способных к восприятию индуктора таргетных морфогенетически компетентных клеток (которые можно определить как “инициальные клетки каллусов”), тогда как экзогенные факторы – как индуктор каллусообразования *in vitro* из таких клеток.

Принципиален вопрос: инициальные клетки уже обладают морфогенетической компетентностью в условиях *in vivo* или именно условия предварительного стресса *in situ* и/или культивирования *in vitro* (в зависимости от используемой методики) индуцируют приобретение инициальными клетками свойства такой компетентности?

Ряд исследователей полагают, что образование каллусов связано с функционированием *in vitro* уже существующих в экспланте *in vivo* клеток, обладающих определенными свойствами. Так, значительная роль статуса инициальных клеток в их компетентности к формированию каллусов продемонстрирована в цикле работ, посвященных культуре *in vitro* незрелых пыльников пшеницы. Установлено, что формирование каллусов при

этом происходит из таких клеток пыльников *in vivo*, как микроспоры (Батыгина и др., 2010), а способность микроспор к индукции образования каллусов определяется главным образом их нестабильным предмитотическим состоянием, структурными свойствами (меристематичностью), а в целом — их статусом ствольных клеток, согласно оригинальной концепции Т.Б. Батыгиной (Батыгина, 2014 и ранее).

Большинство же исследователей считают, что формирование каллуса — это результат индуцированного репрограммирования изначально “нормальных” клеток экспланта в плюри-/тотипотентное состояние в условиях предварительной стрессовой обработки *in situ* или на начальном этапе культивирования *in vitro* (Ikeuchi et al., 2016, 2018, 2019; Feher, 2019; Li et al., 2019). В работе, посвященной обзору исследований генной регуляторной сети при регенерации растений, продемонстрирована роль ряда транскрипционных факторов в клеточном репрограммировании при образовании каллуса, предваряющем регенерацию (Ikeuchi et al., 2018). У некоторых мутантов *Arabidopsis* в условиях *in vivo* идентифицированы гены и транскрипционные факторы, участвующие в образовании каллуса *in vitro* (Cheng et al., 2015). Аналогичные результаты получены при индуцировании формирования каллуса из паренхимной ткани *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2018) и из проростков *Nicotiana* sp. (Li et al., 2019), при этом также выявлено участие систем ряда генов. Вопрос репрограммирования инициальных клеток каллуса решается и в контексте общей проблемы изменчивости генома растений в культуре *in vitro* (Ikeuchi et al., 2015; Rykalo, Dubrovna, 2018), и в связи с изменениями транскрипционных профилей этих клеток (Pasternak, Dudits, 2019). В инициальных клетках каллусов отмечены высокие уровни накопления микроРНК (Chu et al., 2016; Alejandri-Ramirez et al., 2018; Juarez-Gonzalez et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019) — ключевых регуляторов проявления тотипотентности клеток растений и дифференциации их развития (Singh et al., 2018).

Безусловно, морфогенетически компетентные клетки эксплантов способны воспринимать воздействие сигнала индуктора к приобретению плюри-/тотипотентности благодаря соответствующему модифицированному состоянию хроматина (Maury et al., 2019), которое ассоциируется с отдельными программами экспрессии генов (Ojolo et al., 2018; Hajheidari et al., 2019). На примере инициальных клеток каллуса это направление исследований, однако, не представлено в доступной литературе, хотя важная роль модификаций хроматина продемонстрирована для различных растений в индукции такого пути морфогенеза *in vitro*, как соматический эмбриогенез (Duarte-Ake et al., 2019; Mendez-Hernandez et al., 2019).

Чрезвычайно важным является вопрос о дедифференциации специализированных инициальных клеток экспланта — их переходу к пролиферации при формировании каллуса *in vitro*. Еще Скуг и Миллер (Skoog, Miller, 1957) высказывали мнение, что понятие “дедифференциация клеток” теснейшим образом связано с понятием “каллусообразование”; более того, сама структура была названа “каллусом” из-за сходства с мозолью (лат. *callus* — мозоль) — неорганизованно растущей массой дедифференцированных клеток. Каллус с этих позиций традиционно рассматривается как пролиферирующая масса дедифференцированных клеток (Бутенко, 1999; Wang et al., 2011; Motte et al., 2014; Gaillochot, Lohmann, 2015; Iwase et al., 2015; Raizada et al., 2017; Lopez-Ruiz et al., 2019; Popielarska-Konieczna et al., 2020). Заметим, что о важности дедифференциации сообщается и в работах по сигналингу в клетках эксплантов соматического эмбриогенеза *in vitro* (Mendez-Hernandez et al., 2019). Выказано, однако, мнение о том, что дедифференциация в строгом смысле является реверсией дифференциации, поэтому образование каллуса — это результат трансдифференциации клеток, приводящей к повышению потенции развития и/или пролиферации клеток (Sugimoto et al., 2011). В качестве альтернативы термину “дедифференциация” предложен удачный, на наш взгляд, термин “клеточное перепрограммирование” (Ikeuchi et al., 2018). В целом, несмотря на длительную историю изучения, вопрос о дедифференциации клеток до настоящего времени также остается дискуссионным (подробно этот вопрос и используемая терминология проанализированы в работе: Feher, 2019).

Следует подчеркнуть, что далеко не каждая клетка экспланта, даже обладающая *in vivo* свойствами плюри- и тотипотентности, станет инициальной и даст начало каллусу *in vitro*. Выказано мнение, что к известной мере непредсказуемости морфогенеза (при любом пути, не только при каллусогенезе. — *Авт.*) инициальной клетки в условиях *in vitro*, в отличие от вполне предсказуемого морфогенеза зиготы в условиях *in vivo*, приводят эпигенетический характер ее компетентности, “неподходящая” фаза клеточного цикла, при которой хроматин не способен к восприятию сигнала-индуктора, а также низкий уровень специфичности самого сигнала-индуктора (Журавлев, Омелько, 2008). С этим мнением следует согласиться.

В целом, вопрос о морфогенетической компетентности и связанные с этим вопросы репрограммирования и дифференциации/дедифференциации инициальных клеток эксплантов *in vivo*, дающих начало каллусу *in vitro*, следует отнести к дискуссионным.

На примере представителей многих семейств растений, как покрытосеменных, так и голосеменных, установлено, что экспланты, формирующие каллус *in vitro*, должны находиться, как правило, на ранних стадиях развития. Так, данные о преимуществе в индукции каллусообразования эксплантов более ранних стадий развития получены при исследовании незрелых пыльников пшеницы (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Сельдимирова и др., 2016) и риса (Sahoo et al., 2019), семядолей *Arabidopsis* (Raizada et al., 2017), тканей “молодых” корней и надземных органов *Arabidopsis* (Sugimoto et al., 2010), “молодых” листьев *Boea hygrometrica* (Sun et al., 2019), а также апикальных меристем побегов многих растений. Эти результаты можно объяснить тем, что индукция образования каллуса предполагает репрограммирование инициальных клеток, к чему, по видимому, более предрасположены клетки молодых органов. Такие клетки, возможно, способны к более легкому стимулированию дедифференциации в плюри-/тотипотентное состояние путем эпигенетической модификации ДНК и специфических факторов транскрипции.

*Цитофизиологический статус незрелых зародышей злаков в стадии эмбриогенеза in vivo, оптимальной для индукции формирования каллусов in vitro*

Незрелые зародыши злаков как перспективные экспланты для получения каллуса изучаются уже достаточно длительное время (Бутенко и др., 1986 и др.). Исследованиями, специально посвященными сравнительной оценке в индукции каллусообразования *in vitro* зрелых и незрелых зародышей пшеницы (Круглова, Катасонова, 2009; Dagustu, 2014; Бычкова и др., 2016; Круглова и др., 2019a) и кукурузы (Ali et al., 2014; Juarez-Gonzalez et al., 2019), показано, что при прочих равных условиях наибольшим каллусогенным потенциалом обладают именно незрелые зародыши.

Для выявления цитофизиологического статуса незрелых зародышей злаков, оптимальных для формирования каллусов *in vitro*, необходимо знать, на какой стадии эмбриогенеза они находятся.

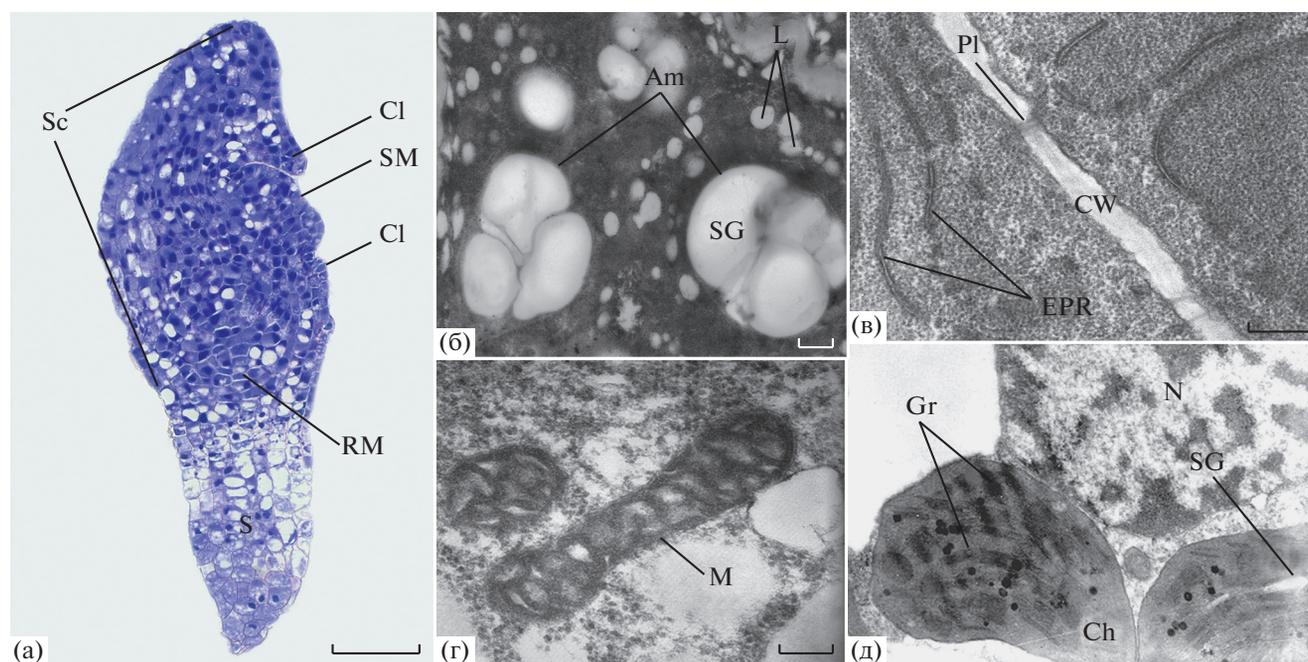
Хорошо известно, что зиготический эмбриогенез растений *in vivo* представляет собой единый процесс, в результате которого из исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциалами взрослого растения. Зародыш развивается согласно определенным паттернам клеточных делений, а выявленные эмбриогенетические законы (закон происхождения, закон чисел, закон расположения, закон экономии) отражают сложность этого процесса (Эмбриология цветковых, 1997, 2000; Батыгина, 2014; De Vries, Weijers, 2017 и др.). В то же время, в своем морфогенезе зародыш

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

Выявление стадии развития незрелого зародыша злаков *in vivo*, оптимальной для получения каллуса *in vitro*, осложнено тем, что при биотехнологических исследованиях представителей этого семейства не используется единая унифицированная периодизация эмбриогенеза. Отсутствие такой периодизации во многом обусловлено особенностями как процесса эмбриогенеза, так и строения зрелого зародыша злаков. Своеобразный дорсовентральный способ развития зародыша начиная с зиготы, специфика органогенеза и уникальное строение высокодифференцированных органов зрелого зародыша дали основание выделить особый тип эмбриогенеза пшеницы – Graminad (Батыгина, 2014 и ранее). Правомочность выделения Graminad-типа эмбриогенеза подтверждается исследованиями эмбриогенеза различных видов злаков (по: Kruglova et al., 2020). Уникальность эмбриогенеза злаков усложняет выделение четких морфологических критериев стадий их развития. В практике культивирования *in vitro* незрелых зародышей злаков большинство авторов в качестве экспланта указывают “незрелый зародыш”, без детализации.

Для решения этой проблемы предложена периодизация эмбриогенеза злаков, достаточно удобная в биотехнологической практике (Круглова, 2012). Автор на основании времени после искусственного опыления предлагает выделять в эмбриогенезе злаков этап недифференцированного зародыша (стадии: зигота, двуклеточный зародыш, четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш), этап морфологической дифференциации зародыша (стадии начала органогенеза, активного органогенеза, завершения органогенеза) и этап дифференцированного зародыша (стадии сформированного зародыша и зрелого зародыша).

Эта периодизация была использована при детальных сравнительных исследованиях формирования каллуса незрелыми зародышами многочисленной группы генотипов пшеницы. Инокулирование в условия культуры *in vitro* незрелых зародышей в выделенных стадиях эмбриогенеза выявило, что у всех изученных генотипов при прочих равных условиях (состав индукционной среды, физиче-



**Рис. 1.** Незрелый зародыш пшеницы в стадии активного органогенеза по данным световой (а) и трансмиссионной электронной (б–д) микроскопии. Условные обозначения: Am – амилопласт, Ch – хлоропласт, CI – колеоптиль, CW – клеточная стенка, EPR – эндоплазматический ретикулум, Gr – грана, L – липидная капля, M – митохондрия, N – ядро, Pl – плазмодесма, RM – меристема корня, S – суспензор, SG – крахмальное зерно, Sc – щиток, SM – меристема побега. Шкала: (а) – 100 мкм, (б) – 500 нм, (в) – 400 нм, (г, д) – 200 нм. (а–г) – ориг. данные; (д) – по: Seldimirova et al., 2017. Пояснения в тексте.

ские условия культивирования *in vitro* и др.) начало морфогенным каллусам давали 12–14-суточные зародыши, находившиеся *in vivo* в стадии активного органогенеза.

Гистологический анализ показал, что для таких зародышей характерно обособление зачатков органов (семядоля–щиток, побег), представленных активно делящимися меристематическими клетками. Важно подчеркнуть, что эти клетки покрыты тонкими оболочками (рис. 1а) (Seldimirova et al., 2017; Круглова и др., 2019а). Клетки характеризуются высокой метаболической активностью, что подтверждается их ультраструктурными показателями (рис. 1б–1д): значительным количеством свободных рибосом, амилопластов, единичных развитых хлоропластов, митохондрий с хорошо развитыми внутренними мембранами, активными комплексом Гольджи и гранулярным эндоплазматическим ретикулумом (Seldimirova et al., 2017).

В ряде работ приводятся сведения о немного иных временных интервалах, прошедших со времени опыления злаков, незрелые зародыши которых формировали каллусы *in vitro*. Так, у пшеницы этот интервал составлял 10–16 сут (Мирошниченко и др., 2014; Dagustu, 2014; Khlebova, Nikitina, 2016), кукурузы – 9–18 сут (Ali et al., 2014; Hong et al., 2017; Juarez-Gonzalez et al., 2019), ячменя – 14–16 сут (Чернов, Пендинен, 2011). Дан-

ные о статусе зародышей авторы не приводят, однако в этот интервал времени незрелые зародыши злаков также, по-видимому, находятся в стадии активного органогенеза, согласно периодизации (Круглова, 2012). Можно полагать, что и в этих случаях начало каллусам дают меристематические клетки зачатков органов зародыша. Такое сходство результатов может свидетельствовать об определенной универсальности стадии эмбриогенеза злаков (а именно – органогенез), во время которой зародыши компетентны к формированию каллуса *in vitro*.

Что касается конкретных органов незрелых зародышей, формирующих каллусы *in vitro*, то выявлено, что у пшеницы (Круглова, Сельдимирова, 2011; Мирошниченко и др., 2014; Seldimirova et al., 2016), кукурузы (Rakshit et al., 2010; Sun et al., 2013; Lowe et al., 2018; Lopez-Ruiz et al., 2019), ячменя (Slesak et al., 2013) каллусы берут начало от семядоли – щитка. Это хорошо отражено, например, на микрофотографиях, представленных в статье Лопез-Руиз с соавт. (Lopez-Ruiz et al., 2019), где приведены данные изучения области формирования каллуса из незрелого зародыша кукурузы методом сканирующей электронной микроскопии.

Сведений о других органах зародыша злаков, участвующих в образовании каллусов, в доступной литературе нами не обнаружено. По-видимому,

му, только определенные органы незрелого зародыша компетентны к каллусообразованию *in vitro*, по крайней мере у изученных в этом отношении злаков.

Гистологически выявлено, что каллусы формируются из клеток эпидермиса щитка незрелых зародышей злаков (подробнее см ниже). Такие наблюдения соответствуют сведениям об активной роли эпидермиса во время развития растений, как это показано, например, молекулярно-генетическими исследованиями этой ткани при формировании корней (Short et al., 2018) и побегов (Iida et al., 2019) *Arabidopsis* в условиях *in vivo*. Следует подчеркнуть, что клетки эпидермиса щитка незрелых зародышей злаков при соответствующих условиях *in vitro* способны к развитию и по пути формирования соматических зародышей, как это выявлено у кукурузы (Lowe et al., 2018).

Известно, что эпидермис щитка по своему генезису представляет собой протодерму, или эмбриодерму — покровную ткань зародыша, у большинства видов, в том числе злаков, формирующуюся на достаточно ранних стадиях эмбриогенеза, при этом стадия вычленения протодермы считается критической в развитии зародыша (Батыгина, 2014 и ранее). В контексте данной статьи особенно важны данные о высокой пролиферативной активности клеток протодермы *in vitro* (по: Андропова, 1997), а также сведения о клетках протодермы как инициальных клетках соматических зародышей злаков *in vitro* (Joshi, Kumar, 2013). Вполне возможно участие протодермы и в формировании каллусов *in vitro*, хотя такого рода сведения в доступной литературе отсутствуют.

Безусловно, важно охарактеризовать структуры, окружающие незрелый зародыш злаков. В условиях *in vivo* покрытые тонкой оболочкой клетки эпидермиса щитка незрелых зародышей граничат с эндоспермом — гетерогенной тканью, служащей не только источником питания зародыша, но, через гормональные сигнальные пути и посредство биохимических, транскрипционных и эпигенетических факторов, — одним из регуляторов развития зародыша в единой системе “зародыш—эндосперм” (Lafon-Placette, Kohler, 2014; Doll et al., 2017; Duarte-Ake et al., 2019). По-видимому, именно пограничное положение клеток эпидермиса щитка во многом способствует индуцированию в них каллусообразования *in vitro*. Неслучайно во многих биотехнологических протоколах для успешного получения каллуса рекомендуется размещать отделенные от эндосперма инокулируемые незрелые зародыши злаков на агаризованную среду именно щитком вниз, для их непосредственного контакта с веществами питательной среды, заменяющие эндосперм (главным образом, индукторами-гормонами, см. ниже), чему способствует проницаемость тонкой

оболочки клеток эпидермиса. В то же время в контексте данной статьи важно подчеркнуть, что и клетки самого эндосперма могут служить источником формирования органогенного каллуса, как это показано для *Actinidia arguta* (Popielarska-Konieczna et al., 2020).

Все эти данные свидетельствуют о высоком морфогенетическом потенциале клеток не только определенных органов незрелых зародышей растений, но и окружающих их тканей.

Немаловажное значение, по-видимому, имеет и позиционное расположение инициальных клеток каллуса в системе клеток и тканей экспланта. Концепция позиционной информации (Wolpert, 2016 и ранее) была предложена для понимания пространственно-временной организации морфогенеза в системе целостного организма. С данной концепцией тесно связана концепция таргетных клеток (Osborne, McManus, 2009), своим индивидуальным позиционным расположением через специфические белковые маркеры детерминированных распознавать специфический эндогенный или экзогенный сигнал к формированию органа (в контексте данного обзора — каллуса. — *Авт.*). Концепция позиционной информации, как и концепция таргетных клеток расценивается исследователями неоднозначно — от активного применения при анализе различных аспектов развития клеток, тканей и органов растений *in vivo*, *in vitro* и *de novo* (Чуб, 2010; Perilli et al., 2012; Chavez-Hernandez et al., 2015; Gaillochet et al., 2015; Janocha, Lohmann, 2018; Lopez-Ruiz et al., 2019), включая изучение влияния позиционно-зависимой регуляции генов на некоторые процессы морфогенеза (Iida et al., 2019), до их оценки как формальных, редуционно-механистических (Jaeger et al., 2008). Этот вопрос также следует отнести к категории дискуссионных. Однако положительной, на наш взгляд, была бы роль этих концепций в понимании того, в каком месте экспланта и почему именно здесь находятся клетки, способные сформировать каллус.

Важно дать оценку эндогенным гормонам в незрелых зародышах злаков на оптимальной для индукции формирования каллусов стадии эмбриогенеза *in vivo*.

Хорошо известно, что в ходе зиготического эмбриогенеза растений *in vivo* постепенно формируется собственная многокомпонентная система гормонов, активно участвующих в регуляции всех процессов роста и развития зародышей. Основную роль в такой регуляции играют ключевые гормоны морфогенеза растений — ауксины, ускоряющие рост клеток, цитокинины, ускоряющие деление клеток, а также абсцизины, тормозящие оба процесса. Этот вопрос, как и связанный с ним вопрос генетического контроля гормональной регуляции развития зародыша, активно

изучается при анализе всех последовательных стадий эмбриогенеза двудольных, особенно – модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Творогова, Лутова, 2018; Radoeva et al., 2019; Smit et al., 2020; Tian et al., 2020). Стимулирующая роль эндогенных гормонов показана и при соматическом эмбриогенезе *in vitro* двудольных, например, *Arabidopsis* (Radoeva et al., 2020).

В отличие от двудольных, исследования роли гормонов и контролирующих их функционирование генов в эмбриогенезе злаков не так многочисленны, достаточно отрывочны и касаются главным образом выявления роли отдельных гормонов на отдельных стадиях развития зародышей (по: Kruglova et al., 2020). Основное внимание исследователи уделяют изучению участия гормонов в формировании покоя и прорастании зрелых зерновок злаков (Zhang et al., 2016; Czajkowska et al., 2019; Seldimirova et al., 2019a; Wang et al., 2019).

Как и у двудольных, у злаков выявлена зависимость формирования и развития зародышей от ауксинов и цитокининов преимущественно на начальных стадиях эмбриогенеза. Установлено, что эти гормоны присутствуют на ранних стадиях эмбриогенеза пшеницы (Hess et al., 2002; Fan et al., 2007; Сельдиминова и др., 2017), кукурузы (Forestan et al., 2010; Doll et al., 2017), риса (Zhao et al., 2019). На оптимальной для формирования каллуса стадии органогенеза выявлена иммуногистохимическая локализация ауксина ИУК в клетках апикальной части зародыша и развивающихся органов зародышей пшеницы (Сельдиминова и др., 2017) и ячменя (Сельдиминова и др., 2018б). Аналогичные данные по ауксинам получены при оценке гормонального статуса незрелых зародышей, дающих начало соматическому эмбриогенезу *in vitro* ряда злаков (Seldimirova et al., 2016, 2019b; Dziurka et al., 2019). Цитокинины также выявлены в начале эмбриогенеза, например, кукурузы (Chen et al., 2014) и ячменя (Сельдиминова и др., 2018б), а также в начале соматического эмбриогенеза *in vitro* пшеницы (Seldimirova et al., 2016; Галин и др., 2018). В целом, главенствующая роль ауксинов и цитокининов на ранних стадиях развития зародышей злаков, как зиготических *in vivo*, так и соматических *in vitro*, вполне объяснима, если учитывать активные морфогенетические процессы в таких зародышах.

Что касается АБК, то у злаков, как и двудольных, повышенное содержание этого гормона выявлено преимущественно в зародышах на поздних стадиях эмбриогенеза и в зрелых зерновках (Hess et al., 2002; Fan et al., 2007; An, Lin, 2011; Wu et al., 2011; Сельдиминова и др., 2018а). Иммуногистохимическими исследованиями подтверждено, что эндогенная АБК откладывается в клетках зародыша пшеницы (Сельдиминова и др., 2017) и ячменя (Сельдиминова и др., 2018а) уже в

сформированных органах. Такие данные можно объяснить тем, что этот гормон предотвращает преждевременное прорастание семян (Miransaria, Smithc, 2014), а также активирует ферменты, катализирующие распад цитокининов, и ингибирует экспрессию генов биосинтеза цитокининов, что, в свою очередь, приводит к снижению активности клеточных делений и торможению ростовых процессов (Веселов и др., 2017). Высказано мнение (Сельдиминова и др., 2018а), что АБК в позднем эмбриогенезе злаков участвует в синтезе активных форм кислорода, разрыхляющих клетки колеоризы, тем самым способствуя прорастанию зародышевого корня/корней. В целом, полученные данные подтверждают важную роль АБК в созревании зародышей злаков и переходе семян к покою, однако, согласно проанализированным литературным данным, этот гормон не проявляет высокой активности в стадии органогенеза зародышей злаков.

Исследования генов, контролирующих гормональную регуляцию эмбриогенеза злаков, также не столь многочисленны и отрывочны в сравнении с аналогичными исследованиями двудольных. Так, у пшеницы (Zhao et al., 2014) и *Aegilops tauschii* (Zhao et al., 2015) изолированы и охарактеризованы гены семейства *WOX*, играющие роль координаторов транскрипции в ходе раннего эмбриогенеза этих злаков. В позднем эмбриогенезе риса выявлена индуцируемая АБК экспрессия гена *OSGH3-2* из семейства *GH3*, модулирующего уровни ауксинов и АБК (Du et al., 2012).

Таким образом, исследования цитофизиологического статуса незрелых зародышей злаков в стадии эмбриогенеза, оптимальной для инициации формирования каллусов на индукционной среде, в целом сравнительно немногочисленны. Однако такого рода исследования, безусловно, важны и перспективны, поскольку статус клеток зародыша как инициальных клеток каллуса играет важнейшую, если не определяющую, роль в инициации формирования каллусов злаков *in vitro*. Кроме того, дифференциация незрелых зародышей злаков служит показателем компетентности их клеток и к дальнейшей регенерации растений в каллусных культурах *in vitro*, как это показано для ячменя (Чернов, Пендинен, 2011), кукурузы (Ali et al., 2014), пшеницы (Dagustu, 2014).

#### ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСОВ ЗЛАКОВ НА ИНДУКЦИОННОЙ СРЕДЕ *IN VITRO* И ИХ ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС

Незрелые зародыши злаков в стадии активного органогенеза размещают на среде, подобранной для индукции формирования каллусов *in vitro*.

Одна из принципиальных проблем в анализируемой области исследований — оценка веществ-стимуляторов (индукторов), вызывающих формирование каллусов *in vitro* инициальной группой клеток незрелых зародышей. Согласно результатам многочисленных исследований, различных эксплантов разных видов растений, в том числе незрелых зародышей злаков, главнейшие индукторы каллусообразования *in vitro*, — гормоны индукционной питательной среды, главным образом ауксины, в том числе синтетические (Motte et al., 2014; Yu et al., 2017; Kruglova et al., 2018a; Shin, Seo, 2018). Высказано мнение, что в процессе гормональной индукции клетки эксплантов испытывают значительный стресс, который запускает действие транскрипционных факторов, способствующих переходу этих клеток к изменению программы развития *in vitro* (Duarte-Ake et al., 2019).

Механизм индуцирующего действия ауксина детально выявлен в ходе экспериментов по культивированию *in vitro* корневых эксплантов *Arabidopsis* на индукционной среде с повышенной концентрацией этого гормона. Установлено, что с помощью трансмембранных PIN-белков ауксин проникает в некоторые клетки перичикла корня (авторы не указывают, по какому принципу “выбираются” клетки; скорее всего, при этом проявляется позиционная информация и/или действие эндогенных сигналов. — *Авт.*) и накапливается в них. Именно такие клетки с локальным максимумом ауксина и сопутствующей локальной активацией ауксиновых ответов, контролируемых носителями притока/оттока ауксина, начинают делиться формированием каллуса. Показано, что эффективнее использовать именно синтетические ауксины, которые не транспортируются из клеток PIN-белками и, в отличие от природных ауксинов, очень слабо метаболизируются и способны входить в клетки независимо от AUX/LAX-носителей ауксинов (Kawochar et al., 2017). Заметим, что поступление эндогенного ауксина в клетки прокамбия выявлено и в условиях *in vivo* при органогенезе корня *Arabidopsis thaliana*, при этом гормон активировал действие транскрипционного фактора *WUS11*, участвующего в формировании инициальных клеток корней (Chen et al., 2016). У этого же растения *in vivo* отмечено, что ингибитор полярного транспорта ауксина влияет на морфогенез листа и генеративных структур при различных фасциациях (Вукоча и др., 2016).

Исследователи приводят данные о получении каллусов из незрелых зародышей злаков на индукционных средах, содержащих, как правило, эмпирически подобранные концентрации гормонов. Однако приводятся сведения и о балансе между содержанием эндогенных и концентрацией экзогенных гормонов, оптимальном для индукции формирования каллусов *in vitro*, из незрелых зародышей пшеницы (Круглова, Сельдиминова,

2011; Miroshnichenko et al., 2017; Seldimirova et al., 2019b), ячменя (Hisano et al., 2016), кукурузы (Rakshit et al., 2010; Hong et al., 2017). Подчеркнем, что баланс эндогенных/экзогенных гормонов рассматривается как важнейший фактор, определяющий индукцию иных, помимо каллусогенеза, путей морфогенеза *in vitro*, например, микроспориального эмбриогенеза (Zur et al., 2016) и его модификации — полиэмбриогенеза (Titova et al., 2016).

Формирование каллусов — достаточно длительный процесс. Так, у пшеницы каллусы образуются на 5 (Круглова, Сельдиминова, 2011, 2018; Seldimirova et al., 2016), у кукурузы — на 7 (Lopez-Ruiz et al., 2019) сутки культивирования незрелых зародышей на индукционной среде.

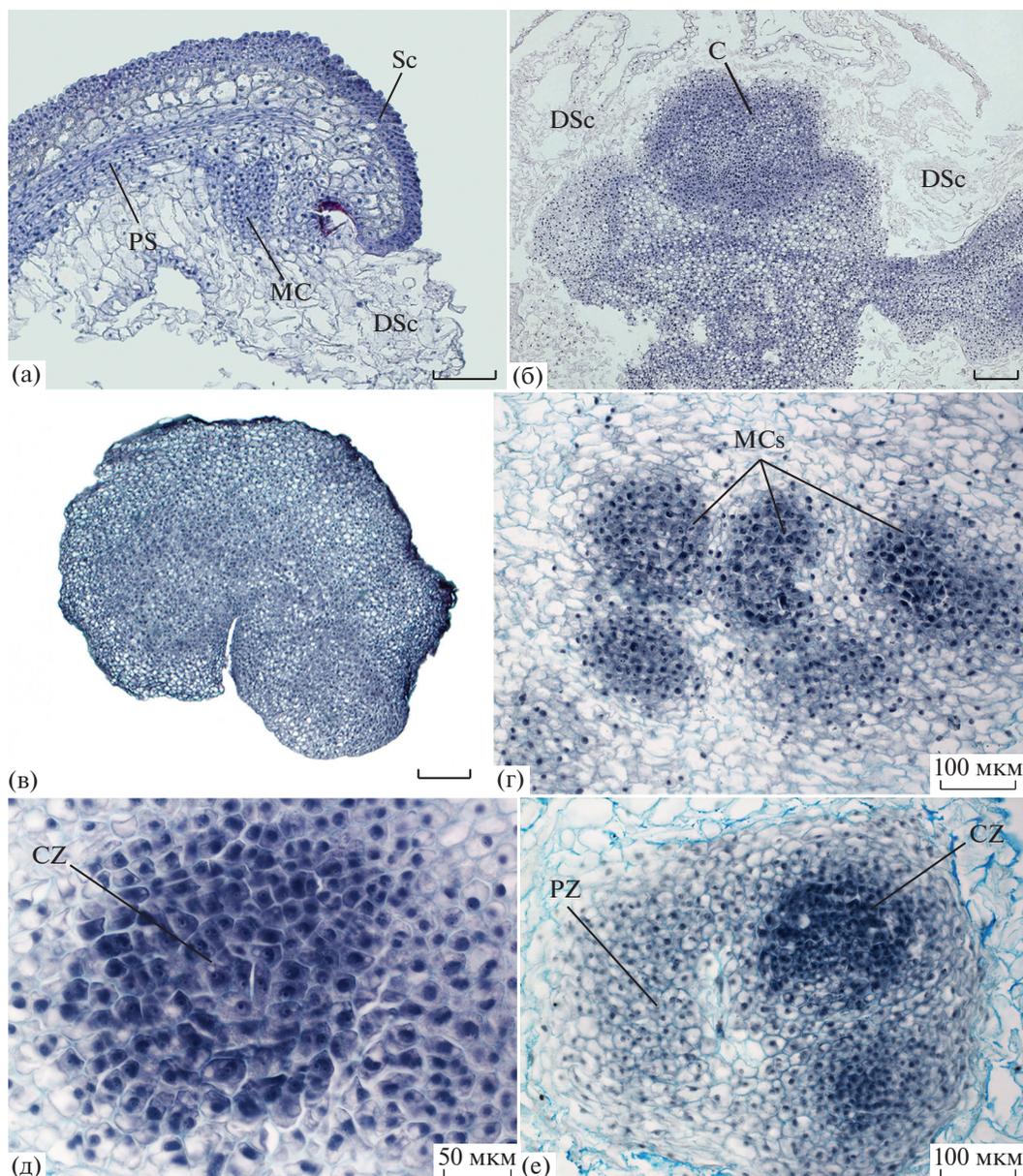
В сравнительно немногочисленных работах анализируется гистологический статус образовавшихся зародышевых каллусов злаков и изменение этого статуса по мере культивирования на индукционной среде *in vitro*.

Детальными исследованиями (Seldimirova et al., 2016) установлено, что у пшеницы каллус образуется из эпидермальных клеток щитка незрелых зародышей или из клеток, располагающихся вдоль прокамбиального тяжа щитка (рис. 2а, 2б). Каллусы интенсивно наращивают массу путем многократных митотических делений (рис. 2в). (Заметим, что аналогичные явления отмечены в условиях *in vivo* при росте меристемы корня *Arabidopsis*, проанализирован и генетический контроль этих процессов: Moubayidin et al., 2010.)

Далее наблюдается постепенное становление гистологической зональности каллусов и гетерогенности их клеток по форме, размерам и строению. При этом в толще каллусов выделяются так называемые морфогенетические очаги (рис. 2г), центральные зоны которых представлены компактно расположенными пролиферирующими меристематическими клетками (рис. 2д). Аналогичные сведения получены для зародышевых каллусов риса (Ijaz et al., 2019) и кукурузы (Lopez-Ruiz et al., 2019).

Ряд авторов не дают отдельного названия таким центральным зонам клеток формирующихся каллусов, сообщая о наличии активно делящихся меристематических клеток в каллусах *in vitro* (Dakshayini et al., 2016). В некоторых работах дается определение каллуса как плюрипотентной клеточной массы (Liu et al., 2014 и др.); можно полагать, что речь в данном случае идет именно о зоне меристематических клеток, а не всего каллуса.

Высказано предположение, что клетки морфогенетического очага зародышевого каллуса пшеницы выполняют функцию, аналогичную инициальным клеткам в апикальных меристемах стебля и корня пшеницы *in vivo* (Евсеева и др., 2007). По нашему мнению, этот вопрос интересен и с точки зрения изучения покоящегося центра



**Рис. 2.** Формирование зародышевого каллуса пшеницы по данным световой микроскопии. Условные обозначения: С – каллус, CZ – центральная зона, DSc – дегенерирующие клетки щитка, MC – меристематические клетки, MCs – морфогенетические очаги, PS – прокамбиальный тяж, PZ – периферическая зона, Sc – щиток. Шкала: (а, б) – 200 мкм, (в) – 500 мкм, (г, е) – 100 мкм, (д) – 50 мкм. (а–в) – по: Seldimirova et al., 2016 с изменениями; (г–е) – ориг. данные. Пояснения в тексте.

меристемы корня растений *in vivo*. Под влиянием различных факторов может произойти активация делений нижнего слоя клеток такого центра (как полагают Рахни с соавт. (Rahni et al., 2016), возможно, это ствольные клетки) в сторону чехлика, что приводит к “открыванию” меристемы (Vystrova et al., 2015; Basile et al., 2017). Вероятно, и в случае морфогенетического очага каллуса *in vitro* происходит такая же активация части его клеток под действием гормонов индукционной среды.

Сопоставление данных иммуногистохимического исследования эндогенных ауксинов и цитокининов в клетках зародышевых каллусов пшеницы с результатами их гистологического анализа показало, что эти гормоны локализируются преимущественно в меристематических клетках активно развивающихся морфогенетических очагов (Seldimirova et al., 2016).

Вокруг центральной зоны меристематических клеток (или меристематического очага/зоны) каллусов пшеницы формируется периферийная

зона рыхло расположенных паренхимных клеток (рис. 2е). В таких клетках отмечена высокая степень вакуолизации – показатель замедления их роста, а в целом старения (по: Халилуев и др., 2014). Аналогичные данные получены и для зародышевого каллуса риса (Ijaz et al., 2019).

Важно заметить, что формирование центральной зоны и окружающей ее периферической зоны клеток выявлено и в условиях *in vivo* в апикальной меристеме побега *Arabidopsis* (Galvan-Amprudia et al., 2016). В этом можно видеть общность клеточных и тканевых механизмов ранних этапов органогенеза *in vivo* и *in vitro*.

Один из решающих факторов формирования каллусов на индукционной среде *in vitro* – межклеточные взаимодействия. Действительно, симпластические взаимодействия посредством плазмодесм в центральной меристематической зоне морфогенетического очага каллусов отличаются от таковых в окружающей паренхиматозной периферической зоне, где количество плазмодесм сильно уменьшено. Симпластический транспорт обеспечивает надежный обмен клеток центральной зоны морфогенетического очага гормонами и иными веществами, необходимыми как для функционирования клеток, так и для координации деятельности клеток в составе таких зон. Это позволяет рассматривать центральную зону меристематических клеток как интегрированную структуру.

Многие авторы сообщают о важности симпластических взаимодействий и в растениях *in vivo*, в частности, в их апикальных и латеральных меристемах (по: Додуева и др., 2014). Важность симпластических взаимодействий выявлена и на различных стадиях соматического эмбриогенеза *in vitro* у *Arabidopsis* (Godel-Jedrychowska et al., 2020).

Отдельная проблема в области исследования формирования каллусов *in vitro* – выявление молекулярно-генетических особенностей этого процесса. Анализ таких публикаций не входит в задачи данной статьи, однако можно рекомендовать работы (Ikeuchi et al., 2018; Xu et al., 2018; Feher, 2019; Li et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019).

Согласно данным многих исследователей, сформированные морфогенные каллусы злаков как зародышевого, так и иного происхождения – это плотные компактные образования, морфологически четко отличающиеся от рыхлых неморфогенных каллусов (подробнее: Зинатуллина, 2020). Различия в морфологических показателях типов каллусов подтверждаются данными, полученными с помощью сканирующего электронного микроскопа (Сельдиминова и др., 2016). Однако после переноса на свежую индукционную среду того же состава каллусы, например, пшеницы, ранее по морфологическим показателям охарактеризованные как неморфогенные, оказались спо-

собны к преобразованию в морфогенные (Круглова, Сельдиминова, 2018). Такие трансформации вносят дополнительные трудности в понимание каллусообразования и каллусогенеза *in vitro*.

Ультраструктурные характеристики клеток сформированных зародышевых каллусов свидетельствуют о наличии в них предпосылок для энергетических затрат в ходе дальнейших активных клеточных делений. Для пшеницы это подтверждается увеличением в клетках количества полисом, диктиосом и липидных включений наряду с наличием в митохондриях развитых крист, а в пластидах – крахмальных зерен (Сельдиминова, Круглова, 2013). Отметим, что аналогичные данные получены и при ультраструктурном анализе формирующихся соматических зародышей пшеницы *in vitro* (Seldimirova et al., 2017).

В целом, в зародышевых каллусах злаков в ходе культивирования на индукционной среде *in vitro* создаются гистологические предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза на регенерационной среде *in vitro*.

Таким образом, несмотря на известную степень изученности структурных (цитогистологических) особенностей формирования и развития зародышевых каллусов злаков *in vitro*, детальные поэтапные сведения о физиологических (гормональных) аспектах их развития от размещения незрелого зародыша на индукционную среду до формирования “зрелого” каллуса отсутствуют. Основное внимание в этой области, как и при изучении каллусов иного происхождения у различных растений, обращается на анализ эндогенного гормонального статуса “зрелого” каллуса непосредственно перед его переносом на регенерационную среду *in vitro*. Это обусловлено практической необходимостью адекватной экзогенной гормональной индукции различных путей морфогенеза в каллусах (Сельдиминова, Круглова, 2015; Hisano et al., 2016; Yu et al., 2017, 2019; Awan et al., 2019 и др.).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* на примере различных растений изучаются в течение достаточно длительного времени. В этой области исследований помимо накопления обширного эмпирического материала сделаны и важные теоретические обобщения. Например, способность к формированию каллусов *in vitro* и регенерации из них полноценных растений расценивается как одно из проявлений пластичности (поливариантности) онтогенеза растений, во многом обусловленной прикрепленным образом жизни (Gaillochot, Lohmann, 2015; Ikeuchi et al., 2016, 2019; Feher, 2019; Maury et al., 2019).

Важнейшая проблема в этой области исследований — характеристика свойств тех эксплантов *in vivo*, которые дадут начало каллусам на индукционной среде *in vitro*. Особое внимание в данном обзоре уделено цитофизиологическим особенностям таких эксплантов, как незрелые зародыши злаков в стадии органогенеза, оптимальных для формирования каллусов *in vitro*. Анализ литературных и собственных данных позволяет предположить, что компетентность клеток незрелых зародышей злаков к формированию каллусов *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародышей в момент инокуляции, а именно — их меристематичности, что обуславливает их способность к репрограммированию в плюрипотентное состояние в начале культивирования *in vitro*. Для злаков, по-видимому, именно природа экспланта (в данном случае — незрелого зародыша) является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток к формированию каллусов. Кроме того, меристематические клетки таких зародышей не только морфогенетически компетентны и плюрипотентны, но и, по-видимому, тотипотентны, поскольку являются исходными для клеток/групп клеток каллусов, реализующих различные пути морфогенеза *in vitro* на регенерационной среде.

В биологии развития растений детально разработано понятие “критическая стадия” для оценки сопряженности морфогенетических и морфофизиологических процессов в развитии эмбриональных структур (Batygina, Vasilyeva, 2003; Шамров, 2008; Батыгина, 2014). Понятие “критическая стадия эмбриогенеза” применено, например, при выявлении относительной автономности зиготических зародышей *in vivo* (Kruglova et al., 2020b) и предложено к применению при анализе соматического эмбриогенеза *in vitro* (Guo et al., 2020) растений. Было бы перспективным проанализировать и стадии развития незрелых зародышей, клетки которых служат инициальными клетками каллусов. Можно полагать, что именно степень дифференциации клеток в зародыше, сопряженная с критическими стадиями эмбриогенеза, определяет их восприимчивость к экзогенным гормонам и переход на индуцированный альтернативный путь каллусообразования *in vitro*.

Еще одно перспективное направление исследований, которому до настоящего времени уделяется недостаточно много внимания, — анализ клеток протодермы незрелого зародыша, обладающих мощным регенерационным потенциалом. Сравнение клеток протодермы с другими клетками зародыша по таким показателям, как, например, локализация гормонов, ультраструктурные характеристики, может способствовать выявлению цитофизиологических механизмов репрограммирования клеток.

К этим важным вопросам следует добавить и вопрос о функциональном взаимодействии эндогенных гормонов на стадии развития незрелого зародыша *in vivo*, оптимальной для формирования каллуса *in vitro*. Действительно, способность гормонов влиять друг друга — одна из важных особенностей гормональной системы растений на разных этапах онтогенеза и при различных условиях произрастания (Maury et al., 2019; Romanenko et al., 2020; Jogawat et al., 2021 и др.). Хотя такие взаимодействия не вызывают сомнений, информация о влиянии одних гормонов на другие в развивающихся зародышах довольно противоречива. Отсутствуют и обобщающие сведения о содержании различных эндогенных гормонов в каллусах злаков в динамике их развития от размещения незрелого зародыша на индукционную среду *in vitro* до формирования “зрелого” каллуса.

Все эти вопросы, по нашему мнению, следует решать исходя из подхода к незрелому зародышу *in vivo* и зародышевому каллусу на индукционной среде *in vitro* как единой (интегрированной) экспериментальной системе. В данной статье на примере злаков мы постарались показать, что морфогенетические события, заложенные в клеточных программах развития незрелых зародышей в условиях *in vivo*, находят свою реализацию при адекватных условиях индукции формирования и развития каллуса *in vitro*. Основанием для использования интегрированной системы “незрелый зародыш *in vivo* — зародышевый каллус *in vitro*” служит базовый принцип универсальности процессов морфогенеза в растениях *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014).

Этот базовый принцип применим и при оценке поднятых в данном обзоре дискуссионных вопросов в связи с исследованием каллусообразования и каллусогенеза *in vivo* (так называемый раневой каллус), а также органогенеза *in vivo* и *in vitro*. Возможно, во всех этих случаях действуют схожие механизмы. Более того, высказано мнение, что каллусогенез *in vitro* следует оценивать как отдельный тип органогенеза *de novo*, сходный с процессом формирования боковых корней *in vivo* (Liu et al., 2014).

В литературе не раз поднималась проблема использования культивируемых *in vitro* эксплантов (Бутенко, 1999; Носов, 1999; Mashkina, Tabatskaya, 2020 и др.) и особенно каллусов (Ikeuchi et al., 2016, 2019; Kruglova et al., 2018a, 2018b, 2020b; Kruglova и др., 2019b; Feher, 2019 и др.) в качестве модельных систем при исследовании морфогенеза растений *in vivo*. Действительно, несмотря на то, что морфогенез *in vitro* не менее сложен, чем *in vivo*, каллусы, культивируемые в строго контролируемых экспериментатором условиях *in vitro*, можно расценивать как перспективные модельные системы для оценки различных взаимодей-

ствующих морфогенетических процессов и механизмов их регуляции. Основанием для использования каллусных моделей служат как свойства их меристематических клеток (плюри- и тотипотентность), так и морфогенетические события, происходящие в каллусах *in vitro* (дифференциация/дидифференциация, репрограммирование развития, дифференциальная экспрессия генов).

Экспериментальная система “незрелый зародыш *in vivo* – зародышевый каллус *in vitro*” может послужить адекватной моделью при изучении различных аспектов сложнейшего биологического феномена морфогенеза растений как *in vitro*, так и *in vivo*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Статья подготовлена при выполнении тем № АААА-А18-118022190099-6 (Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, государственное задание Минобрнауки России № 075-00326-19-00) и № АААА-А18-118051590112-8 (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН) в рамках договора о творческом сотрудничестве между институтами.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова и А.Е. Зинатуллина подготовили первоначальный вариант текста обзора с использованием литературных и оригинальных данных. Г.Е. Титова проанализировала основные положения статьи и внесла ценные дополнения. Все авторы участвовали в обсуждении окончательного варианта статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андропова Е.В. Протодерма // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 346–352.

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

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФЕК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

Бутенко Р.Г., Джардемалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Каллусообразующая способность эксплантов из разных органов различных сортов озимой пшеницы // Физиол. раст. 1986. Т. 33. Вып. 2. С. 350–355.

Бычкова О.В., Ерещенко Д.В., Розова М.А. Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре // Acta Biol. Sib. 2016. Т. 2. № 2. С. 76–80.

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

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

Додуева И.Е., Ганчева М.С., Осипова М.А. и др. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // Физиол. раст. 2014. Т. 61. № 5. С. 611–631.

Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. и др. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 2. С. 306–311.

Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. 2008. Т. 55. № 5. С. 643–664.

Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи соврем. биол. 2020. Т. 140. № 1. С. 183–194.

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

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.

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

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

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2018. № 2. С. 61–65.

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

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2019б. № 2. С. 44–54.

Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Том 2. Рост и морфогенез. Нижневартовск: Изд-во Нижневартовского ун-та, 2014. С. 26–30.

Мирошниченко Д.Н., Соколов Р.Н., Аликина О.В. и др. Скрининг регенерационного потенциала ди-, тетра- и гексаплоидных сортов и видов пшеницы в культуре *in vitro* // Биотехнология. 2014. № 1. С. 38–51.

- Никитина Е.Д. Формообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. и их взаимосвязь // Вестн. Алтайского гос. агр. ун-та. 2014. № 4. С. 48–52.
- Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // Изв. Алтайского гос. ун-та. Биол. науки. 2014. Т. 3. № 1. С. 46–50.
- Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 565–573.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиновых каллусах пшеницы *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2015. № 1. С. 33–39.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н. и др. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2017. № 3. С. 114–118.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Кудоярова Г.Р. и др. Влияние АБК на созревание зародышей ячменя *in vivo*: результаты изучения дефицитного по АБК мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018а. Т. 1. № 4. С. 203–211.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р. и др. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта Стертое и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018б. Т. 1. № 3. С. 134–142.
- Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Изв. РАН. Серия биол. 2016. № 2. С. 155–161.
- Творогова В.Е., Лутова Л.А. Генетическая регуляция зиготического эмбриогенеза у покрытосеменных растений // Физиол. раст. 2018. Т. 65. № 1. С. 3–17.
- Халилуев М.Р., Богоутдинова Л.Р., Баранова Г.Б. и др. Зависимость каллусообразования и органогенеза побегов томата (*Solanum lycopersicum* L.) *in vitro* от генотипа, типа экспланта и состава питательной среды // Изв. РАН. Серия биол. 2014. № 6. С. 586–596.
- Чернов В.Е., Пендинен Г.И. Сравнительная оценка каллусогенеза и регенерации у различных видов ячменя // Сельскохозяйств. биол. 2011. № 1. С. 44–53.
- Чуб В.В. Роль позиционной информации в регуляции развития органов цветка и листовых серий побегов. М.: Бином, 2010. 263 с.
- Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 350 с.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя. СПб.: Мир и семья, 1997. 824 с.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. СПб.: Мир и семья, 2000. 652 с.
- Alejandri-Ramirez N.D., Chavez-Hernandez E.C., Contreras-Guerra J.L. et al. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeno maize embryogenic callus induction and establishment // Plant Physiol Biochem. 2018. V. 122. P. 78–89.
- Ali F., Ahsan M., Saeed N.A. et al. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*) // Int. J. Agric. Biol. 2014. V. 16. P. 111–117.
- An Y.-Q., Lin L. Transcriptional regulatory programs underlying barley germination and regulatory functions of gibberellin and abscisic acid // BMC Plant Biol. 2011. V. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-105>
- Awan M.F., Iqbal M., Sharis M.N. et al. Evaluation of genotypic and hormone mediated callus induction and regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) // Int. J. Bot. Stud. 2019. V. 4. P. 70–76.
- Basile A., Fambrini M., Pugliesi C. The vascular plants: open system of growth // Dev. Genes. Evol. 2017. V. 227. P. 129–157.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 2003. V. 45. P. 27–36.
- Bykova E.A., Chergintsev D.A., Vlasova T.A. et al. Effect of the auxin polar transport inhibitor on the morphogenesis of leaves and generative structures during fasciation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 207–215.
- Bystrova E.I., Zhukovskaya N.V., Rakitin V.J. et al. Role of ethylene in activation of cell division in quiescent center of exised maize roots // Russ. J. Dev. Biol. 2015. V. 46. P. 60–64.
- Chavez-Hernandez E.C., Alejandri-Ramirez N.D., Contreras-Guerra L.L. et al. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00555>
- Chen J., Lausser A., Dresselhaus T. Hormonal responses during early embryogenesis in maize // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. P. 325–331.
- Chen L., Tong J., Xiao L. et al. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 4273–4284.
- Cheng Y., Liu H., Cao L. et al. Down-regulation of multiple CDK inhibitor *ICK/KRP* genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00825>
- Chu Z., Chen J., Xu H. et al. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* cultures // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01302>
- Czajkowska B.I., Finlay C.M., Jones G. et al. Diversity of a cytokinin dehydrogenase gene in wild and cultivated barley // PLoS One. 2019. V. 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225899>
- Dagustu N. Comparison of callus formation and plantlet regeneration capacity from immature embryo culture of

- wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes // Biotech. Bio-technol. Equipm. 2014.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817552>
- Dakshayini K., Vaman R.C., Karun A. et al. High-frequency plant regeneration and histological analysis of callus in *Cichorium intybus*: An important medicinal plant // J. Phytol. 2016. V. 8. P. 7–12.
- De Vries S.C., Weijers D. Plant embryogenesis // Curr. Biol. 2017. V. 27. P. 870–873.
- Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M. et al. Signaling in early maize kernel development // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 375–388.
- Du H., Wu N., Fu J. et al. A GH3 family member, *OsGH3-2*, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 6467–6480.
- Duarte-Ake F., Nic-Can G., De-la-Peca C. Chapter 13. Somatic embryogenesis: polycomb complexes control cell-to-embryo transition // Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications. Springer Nature Switzerland AG, 2019. P. 339–354.
- Dziurka K., Dziurka M., Warchol M. et al. Endogenous phytohormone profile during oat (*Avena sativa* L.) haploid embryo development // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2019. V. 55. P. 221–229.
- Fan G.-Q., Liu F., Shao Q.-Q. et al. Relations among wheat (*Triticum aestivum* L.) protein, starch contents and endogenous hormone contents during kernel development // Plant Physiol. Comm. 2007. V. 43. P. 36–40.
- Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // Front. Plant Sci. 2019.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Forestan C., Meda S., Varotto S. *ZmPIN1*-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 1373–1390.
- Gaillochet C., Daum G., Lohmann J.U. O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem patterning // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 23. P. 91–97.
- Gaillochet C., Lohmann J.U. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity // Development. 2015. V. 142. P. 2237–2249.
- Galvan-Ampudia C.S., Chaumeret A.M., Godin C. et al. Phyllotaxis: from patterns of organogenesis at the meristem to shoot architecture // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2016. V. 5. P. 460–473.
- Godel-Jedrychowska K., Kulinska-Lukaszek K., Horstman A. et al. Symplasmic isolation marks cell fate changes during somatic embryogenesis // J. Exp. Bot. 2020.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa041>
- Guo H., Fan Y., Guo H. et al. Somatic embryogenesis critical initiation stage-specific <sup>3</sup>CHH hypomethylation reveals epigenetic basis underlying embryogenic redifferentiation in cotton // Plant Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 1648–1650.
- Hajheidari M., Koncz C., Bucker M. Chromatin evolution-key innovations underpinning morphological complexity // Front. Plant Sci. 2019.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00454>
- Hess J.R., Carman J.G., Banowitz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony // Plant Physiol. 2002. V. 159. P. 379–386.
- Hisano H., Matsuura T., Mori I.C. et al. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 99. P. 66–72.
- Hong J.K., Park K.J., Lee G.-S. et al. Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of various maize genotypes (*Zea mays* L.) // J. Plant Biotechnol. 2017. V. 44. P. 49–55.
- Iida H., Yoshida A., Takada S. ATML1 activity is restricted to the outermost cells of the embryo through post-transcriptional repressions // Development. 2019. V. 146.  
<https://doi.org/10.1242/dev.169300>
- Ijaz B., Sudiro C., Hyder M.Z. et al. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2019.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-019-09974-6>
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al. Molecular mechanisms of plant regeneration // Ann. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 377–406.
- Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 28. P. 60–67.
- Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A. et al. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms // Development. 2016. V. 143. P. 1442–1453.
- Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B. et al. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 770–782.
- Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159–3173.
- Iwase A., Mita K., Nonaka S. et al. *WIND1*-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 389–397.
- Jaeger J., Irons D., Monk N. Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information // Development. 2008. V. 135. P. 3175–3183.
- Janocha D., Lohmann J.U. From signals to stem cells and back again // Curr. Opin. Plant Biol. 2018. V. 45. P. 136–142.
- Jogawat A., Yadav B., Chhaya et al. Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review // Physiol. Plant. 2021.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.13328>
- Joshi R., Kumar P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review // Agr. Rev. 2013. V. 34. P. 1–20.
- Juarez-Gonzalez V., Lopez-Ruiz B.A., Baldrich P. et al. The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis // Sci. Rep. 2019. V. 9.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y>
- Kawochar M.A., Ahmed N.U., Hossain M.I. et al. Role of the explants and NAA on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*) // Amer. J. Life Sci. 2017. V. 5. P. 140–144.

- Khlebova L.P., Nikitina E.D.* Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants // *Acta Biol. Sib.* 2016. V. 2. P. 68–75.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A.* Callusogenesis as a *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018a. V. 49. P. 245–259.
- Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E.* *In vitro* callus as a model system for the study of plant stress-resistance to abiotic factors (on the example of cereals) // *Biol. Bull. Rev.* 2018b. V. 8. P. 518–526.
- Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E.* Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // *Biol. Bull. Rev.* 2020a. V. 10. P. 115–126.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. et al.* Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals) // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020b. V. 51. P. 1–15.
- Lafon-Placette C., Kohler C.* Embryo and endosperm, partners in seed development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2014. V. 17. P. 64–69.
- Lee K., Seo P.J.* Dynamic epigenetic changes during plant regeneration // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 235–247.
- Li K., Wang J., Liu C. et al.* Expression of *AtLEC2* and *AtIPTs* promotes embryogenic callus formation and shoot regeneration in tobacco // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1907-7>
- Liu J., Sheng L., Xu Y. et al.* *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 1081–1093.
- Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E. et al.* Development-related miRNA expression and target regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of tuxpeno VS-535 maize cultivar // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092079>
- Lowe K., La Rota M., Hoerster G. et al.* Rapid genotype “independent” *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2018. V. 28. P. 1998–2015.
- Mashkina O.S., Tabatskaya T.M.* Morphogenesis of a dissected birch leaf *in vitro* culture // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. № 6. P. 397–409.
- Maury S., Sow M.D., Le Gac A.-L. et al.* Phytohormone and chromatin crosstalk: the missing link for developmental plasticity? // *Front. Plant Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395>
- Mendez-Hernandez H.A., Ledezma-Rodriguez M., Avilez-Montalvo R.N. et al.* Signaling overview of plant somatic embryogenesis // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Miransaria M., Smith D.L.* Plant hormones and seed germination // *Env. Exp. Bot.* 2014. V. 99. P. 110–121.
- Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M. et al.* Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species // *PLoS One.* 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173533>
- Motte H., Vereecke D., Geelen D. et al.* The molecular path to *in vitro* shoot regeneration // *Biotech. Adv.* 2014. V. 32. P. 107–121.
- Moubayidin L., Perilli S., Dello Ioio R. et al.* The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. P. 1138–1143.
- Ojolo S.P., Cao S., Priyadarshani S. et al.* Regulation of plant growth and development: a review from a chromatin remodeling perspective // *Front. Plant Sci.* 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01232>
- Oliveira E.J., Koehler A.D., Rocha D.I. et al.* Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon* // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 2017–2034.
- Osborne D., McManus M.* Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. 268 p.
- Pasternak T., Dudits D.* Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis *in vivo* and *in vitro* // *Front. Plant Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00778>
- Perilli S., Di Mambro R., Sabatini S.* Growth and development of the root apical meristem // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 17–23.
- Popielarska-Konieczna M., Sala K., Abdullah M. et al.* Extracellular matrix and wall composition are diverse in the organogenic and non-organogenic calli of *Actinidia arguta* // *Plant Cell Reports.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02530-2>
- Pykalo S.V., Dubrovna O.V.* Variability of the *Triticale* genome *in vitro* // *Cytol. Genet.* 2018. V. 52. P. 385–393.
- Radoeva T., Lokerse A.S., Llavata-Peris C.I. et al.* A robust auxin response network controls embryo and suspensor development through a basic helix loop helix transcriptional module // *Plant Cell.* 2019. V. 31. P. 52–67.
- Radoeva T., Albrecht C., Piepers M. et al.* Suspensor-derived somatic embryogenesis in *Arabidopsis* // *Development.* 2020. V. 147. <https://doi.org/10.1242/dev.188912>
- Rahni R., Efroni I., Birnbaum K.D.* A case for distributed control of local stem cell behavior in plants // *Dev. Cell.* 2016. V. 38. P. 635–642.
- Raizada M.N., Goron T.L., Bannerjee O. et al.* Loss of developmental pluripotency occurs in two stages during leaf aging in *Arabidopsis thaliana* // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2017. V. 53. P. 178–187.
- Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J.C. et al.* Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010. V. 100. P. 31–37.
- Rober-Kleber N., Albrechtova J.T.P., Fleig S. et al.* Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development // *J. Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 1302–1312.
- Rocha D.I., Vieira L.M., Koehler A.D. et al.* Cellular and Morpho-histological foundations of *in vitro* plant regeneration // *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology.* New York, NY: Humana Press, 2018. V. 1815. P. 47–68.

- Romanenko K.O., Babenko L.M., Vasheka O.V. et al. *In vitro* phytohormonal regulation of fern gametophytes growth and development // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. P. 71–83.
- Sahoo S.A., Jha Z., Verulkar S.B. et al. High-throughput cell analysis based protocol for ploidy determination in anther-derived rice callus // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01561-2>
- Schuster C., Gaillochet C., Medzihradzky A. et al. A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals // Dev. Cell. 2014. V. 28. P. 438–449.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2016. V. 52. P. 251–264.
- Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Titova G.E. et al. Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo* zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development // Russ. J. Dev. Biol. 2017. V. 48. P. 185–197.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M. et al. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // Seed Sci. Res. 2019a. V. 29. P. 1–9.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Somatic embryogenesis in wheat and barley callus *in vitro* is determined by the local of indoleacetic and abscisic acids // Russ. J. Dev. Biol. 2019b. V. 50. P. 124–135.
- Shen Y., Jiang Z., Yao X. et al. Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation // PLoS One. 2012. V. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032237>
- Shin J., Seo P.J. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells // Front. Plant Sci. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01653>
- Short E., Leighton M., Imriz G. et al. Epidermal expression of a sterol biosynthesis gene regulates root growth by a non-cell-autonomous mechanism in *Arabidopsis* // Development. 2018. V. 145. <https://doi.org/10.1242/dev.160572>
- Singh A., Gautam V., Singh S. et al. Plant small RNAs: Advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development // Planta. 2018. V. 248. P. 545–558.
- Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // Sympos. Soc. Exp. Biol.: Proceed. 1957. V. 11. P. 118–130.
- Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. et al. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. P. 30–37.
- Smit M.E., Llavata-Peris C.I., Roosjen M. et al. Specification and regulation of vascular tissue identity in the *Arabidopsis* embryo // Development. 2020. V. 147. <https://doi.org/10.1242/dev.186130>
- Su Y.H., Liu Y.B., Zhang X.S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 616–625.
- Sugimoto K., Jiao I., Meyerowitz E.M. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs *via* root development pathway // Dev. Cell. 2010. V. 18. P. 463–471.
- Sugimoto K., Gordon S.P., Meyerowitz E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? // Trends Cell Biol. 2011. V. 21. P. 212–218.
- Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 349–359.
- Sun L., Wu Y., Zou H. et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2013. V. 113. P. 103–119.
- Sun R.Z., Zuo E.H., Qi J.F. et al. A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves // Funct. Integr. Genomics. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00701-3>
- Tian R., Paul P., Joshi S. et al. Genetic activity during early plant embryogenesis // Biochem. J. 2020. V. 477. P. 3743–3767.
- Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N. et al. Phenomenon of “siamese embryos” in cereals *in vivo* and *in vitro*: Cleavage polyembryony and fasciations // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 122–137.
- Tuskan G.A., Mewalal R., Gunter L.E. et al. Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach // PLoS One. 2018. V. 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202519>
- Wang C., Wang G., Gao Y. et al. A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice // Plant Mol. Biol. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5>
- Wendrich J.R., Möller B.K., Uddin B. et al. A set of domain-specific markers in the *Arabidopsis* embryo // Plant Reprod. 2015. V. 28. P. 153–160.
- Wolpert L. Positional information and pattern formation // Curr. Top. Dev. Biol. 2016. V. 117. P. 597–608.
- Wu K., Wang J., Kong Z. et al. Characterization of a single recessive yield trait mutant with elevated endogenous ABA concentration and deformed grains, spikelets and leaves // Plant Sci. 2011. V. 180. P. 306–312.
- Xu C., Cao H., Zhang Q. et al. Control of auxin-induced callus formation by *bZIP59-LBD* complex in *Arabidopsis* regeneration // Nat. Plants. 2018. V. 4. P. 108–115.
- Xu Y., Zhang W., Gao Y. et al. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*) // Planta. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1535-4>
- Yu J., Liu W., Liu J. et al. Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385>
- Yu Y., Qin W., Li Y. et al. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities // Plant Growth Regul. 2019. V. 87. P. 187–199.
- Zhang W., Wang X., Fan R. et al. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos // J. Integr. Agricult. 2015. V. 14. P. 11–19.

- Zhang W., Cao Z., Zhou Q. et al. Grain filling characteristics and their relations with endogenous hormones in large- and small-grain mutants of rice // PLoS One. 2016. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165321>
- Zhao J., Zhou C., Yang H.Y. Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. // Plant Cell Repts. 2000. V. 19. P. 321–326.
- Zhao J., Yu N., Ju M. et al. ABC transporter *OsABCG18* controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice // J. Exp. Bot. 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz382>
- Zhao S., Jiang Q., Ma J. et al. Characterization and expression analysis of *WOX5* genes from wheat and its relatives // Gene. 2014. V. 537. P. 63–69.
- Zhao S., Jiang Q.-T., Ma J. et al. Characterization and expression analysis of *WOX2* homeodomain transcription factor in *Aegilops tauschii* // Genet. Mol. Biol. 2015. V. 38. P. 79–85.
- Zur I., Dubas E., Krzewska M. et al. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis // Front. Plant Sci. 2016. P. 110–109.

## Cytophysiological Features of the Experimental System “Embryo *in vivo* – Callus *in vitro*” of Cereals

N. N. Kruglova<sup>1,\*</sup>, G. E. Titova<sup>2</sup>, O. A. Seldimirova<sup>1</sup>, and A. E. Zinatullina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ufa Institute of Biology, UFRС of RAS, pr. Oktyabrya 69, Ufa, 450054 Russia

<sup>2</sup>Komarov Botanical Institute of RAS, ul. Professor Popov 2, St. Petersburg, 197376 Russia

\*e-mail: [kruglova@anrb.ru](mailto:kruglova@anrb.ru)

The most important problem in the study of plant calli *in vitro* is the relationship between endogenous and exogenous factors that affect the formation of calli (“callus formation”) and their development in induction medium (“callus genesis”). Of particular interest is such an endogenous factor as the cytophysiological status of explants *in vivo* and calli *in vitro* at the dynamics of culture. In the review uses the example of cereals are analyzed the literature and own data on the identification of histological and hormonal features of initial callus cells in explants – immature embryos *in vivo*, as well as morphogenic calli formed from them during development *in vitro*. The answers to some discussion questions related to the induction of morphogenetic competence and development reprogramming of initial callus cells presented in the literature are considered. The comparison of callus formation and callus genesis *in vitro* with some similar events *in vivo* confirms the validity of the principle of morphogenesis universality *in vivo* and *in vitro* (Batygina, 2014 and earlier). The perspective of using the single (integrated) experimental system “embryo *in vivo* – callus *in vitro*” as a model for studying the most complex biological phenomenon – plant morphogenesis is discussed.

**Keywords:** embryo *in vivo*, callus *in vitro*, cytophysiology, plant morphogenesis, cereals

УДК 576.524

## ПРОБЛЕМА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АПОПТОЗА ПРИ КРИОХРАНЕНИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В СУСПЕНЗИИ

© 2021 г. А. Н. Попова<sup>a, \*</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>a, b, \*\*</sup>

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

<sup>b</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: popova.anna.n@gmail.com

\*\*e-mail: vorotelyak@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.03.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята к публикации 30.03.2021 г.

Криохраниение кератиноцитов человека — обязательный этап создания эпидермального эквивалента кожи. Однако перевода клетки в суспензию и замораживая их, мы сталкиваемся с проблемой активации терминальной дифференцировки и апоптоза в кератиноцитах, что приводит к потере стволовых и прогениторных клеток в культуре. При разрыве связи между  $\beta 1$ -интегрином и внеклеточным матриксом в момент перевода клеток в суспензию происходит практически одновременное включение сигнального пути PI3K/Akt, стимулирующего дифференцировку, и апоптотического пути Caspase-8. Мы предположили, что замедляя процессы терминальной дифференцировки разными путями — добавляя растворимый фибронектин, а также ингибиторы PI3-kinase и Caspase-8 в среду для разморозки — возможно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, стволовых клеток после криохраниения кератиноцитов в суспензии.

*Ключевые слова:* кератиноциты, криохраниение, дифференцировка, апоптоз

**DOI:** 10.31857/S0475145021040066

Поводом к написанию данного обзора послужила для нас необходимость сохранения стволовых клеток (СК) после криохраниения кератиноцитов в суспензии. Это важно, в частности, когда речь идет о применении клеток в составе биомедицинских клеточных продуктов для регенеративной медицины. Криохраниение культур кератиноцитов дает возможность планирования хирургических вмешательств, накопления материала для последующих операций, проведения контроля качества, транспортировки полученных тканевых эквивалентов (Jackson et al., 2014). Данных о применении культивированных кератиноцитов человека, замороженных в суспензии, мало, но при этом показано, что жизнеспособность клеток после заморозки в суспензии и в монослое примерно одинакова при существенно более высокой сложности процедуры хранения в монослое (Pasch et al., 2000). Кроме того, доказано, что некоторые протоколы криохраниения стимулируют пролиферативный потенциал клеток. Предположительно, это связано с селекцией наиболее устойчивых и быстро пролиферирующих кератиноцитов (Naaldijk et al., 2016). Сохранение недифференцированного фенотипа культивированных кератиноцитов кожи и роговицы после криоконсервации играет немало-

важную роль для позитивного эффекта трансплантации у ожоговых пациентов (De Luca et al., 2006; Jackson et al., 2017). Так, высокий процент низкодифференцированных кератиноцитов в составе трансплантата при лечении пациентов с лимбальноклеточной недостаточностью ожоговой этиологии приводит к значимому улучшению клинических результатов (Rama et al., 2010). Одновременное сохранение недифференцированного фенотипа и высокого пролиферативного потенциала в культуре кератиноцитов необходимо для формирования многослойного пласта кератиноцитов, в котором достигнут баланс между пролиферацией и дифференцировкой (Metral et al., 2017). Хранение кератиноцитов также необходимо в работе клеточных банков и коллекций клеточных культур. Поскольку популяция первичных кератиноцитов гетерогенна и содержит клетки разного уровня дифференцировки, в том числе эпидермальные стволовые, для успешной рекультикации после разморозки и ведения культуры критическим является сохранения пула стволовых и прогениторных клеток.

Хранение кератиноцитов в суспензии зачастую представляет собой проблему, поскольку жизнеспособность и степень дифференцировки

этих клеток строго зависят от наличия контактов с субстратом. Таким образом, обычные для других клеток потери, вызванные повреждающим действием криохранения, усугубляются индукцией дифференцировочных процессов, которые в случае кератиноцитов означают выход из клеточного цикла и последующую гибель. Существует ряд концепций эффективного криохранения (Woelders, 2004; Muller, 2004; Meryman, 2007; Rao, 2012; Averill-Bates, 2014), однако очевидно, что для кератиноцитов одним из основных условий успешного выхода после заморозки является быстрое восстановление межклеточных и клеточно-матриксных контактов.

В нашей работе мы сталкиваемся с тем, что клетки, вышедшие живыми после криохранения в суспензии (окраска трипановым синим), оказываются неспособны прикрепиться к матриксу или открепляются от него в течение первых трех суток. Обращает на себя внимание тот факт, что количество прикрепившихся клеток зависит от состава внеклеточного матрикса (ВКМ) и от плотности посева кератиноцитов (неопубликованные данные). При этом не все клетки гибнут — продолжит кератиноцит пролиферировать или перейдет к дифференцировке либо апоптозу, как известно, напрямую зависит от количества  $\beta 1$ -интегрина на его мембране (Tiberio et al., 2002). Так как сигналинг от интегрина является ключевым условием выживания клетки (Pozzi et al., 1998), мы рассмотрим здесь  $\beta 1$ -интегрин как узловой элемент, который через взаимодействие с различными лигандами создает систему, необходимую для сохранения пролиферативной активности клеток и интегрирует пути апоптоза и дифференцировки кератиноцитов. В данном случае важно понять, как можно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, СК после криохранения кератиноцитов в суспензии. Мы рассмотрим различные варианты воздействия на молекулу  $\beta 1$ -интегрина, чтобы определить, насколько разными могут быть механизмы и последствия такого воздействия, и какие воздействия можно оказывать для сохранения жизнеспособности кератиноцитов после травмы криохранения.

Роль межклеточных и клеточно-матриксных контактов в поддержании пролиферации и сохранении СК давно изучается. Ключевую роль в процессе дифференцировки кератиноцитов играет ERK-МАРК сигнальный путь (Zhu et al., 1999; Levy et al., 2000; Haase et al., 2001; Evans et al., 2003). Доказано, что система  $\beta 1$ -интегрин—МАРК *in vitro* участвует в поддержании СК эпидермиса в недифференцированном состоянии. При нарушении сигналинга от интегрина, в частности от  $\beta 1$ , этот баланс может быть нарушен. Так, трансфекция культуры человеческих кератиноцитов мутантным  $\beta 1$ -интегрином (доминантная негатив-

ная мутация), уменьшая экспрессию  $\beta 1$  на поверхности клеток, приводит к снижению клеточной адгезии и супрессии МАРК пути, что является стимулом к дифференцировке СК (Zhu et al., 1999).

Кроме того, доказано, что процесс пролиферации и дифференцировки напрямую зависит от взаимодействия  $\beta 1$ -интегрин с рецепторами к факторам роста. Известно, что один из основных путей влияния интегрина на рецепторы к факторам роста — процесс транзактивации. Рецепторы к эпидермальному фактору роста (EGFR), тромбцитарному фактору роста (PDGFR), фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR) и др. активируются в результате связывания интегрина с молекулами ВКМ (Moro et al., 1998; Soldi et al., 1999; Danilkovitch-Miagkova et al., 2000; Miranti et al., 2002). Обратное тоже справедливо, и рецепторы к факторам роста способны к транзактивации интегрина (Bagutti et al., 1996; Grassian et al., 2011). Активация EGFR, например, приводит к повышению экспрессии  $\beta 1$  и наоборот (Wang et al., 1998). В работе Багутти (Bagutti et al., 2001) авторы исследовали роль различных факторов в процессе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши в эпидермальном направлении. Они показали, во-первых, что ни контакт с базальной мембраной, ни межклеточные взаимодействия с эпидермальными кератиноцитами так не стимулировали ЭСК к дифференцировке, как сокультивирование их с фибробластами, синтезирующими в среду факторы роста. Кроме того, они обнаружили, что ЭСК, полученные путем трансфекции вектором, блокирующим ген  $\beta 1$ -интегрин, обладали меньшей чувствительностью к факторам роста фибробластов (aFGF, bFGF), фактору роста кератиноцитов (KGF), трансформирующему фактору роста (TGF $\alpha$ ), чем ЭСК дикого типа, и нуждались в их более высокой концентрации в культуральной среде для начала дифференцировки.

Таким образом, сигнал от интегрин  $\beta 1$ , связанного с ВКМ, а кроме того с рецепторами к факторам роста, необходим для сохранения баланса между пролиферацией и дифференцировкой. При этом отсутствие сигнала от  $\beta 1$ -интегрин, связанного с матриксом, приводит к бесконтрольной пролиферации, что и наблюдается в ряде злокачественных опухолей, которые даже при потере контакта с белками матрикса продолжают пролиферировать (Hanahan et al., 2000; Reginato et al., 2003).

Одна из ключевых проблем криохранения кератиноцитов — перевод их в суспензию. Давно известно, что переход нормальных кератиноцитов в суспензию сопровождается началом их дифференцировки (Watt et al., 1993). Показано, что кератиноциты в суспензии начинают активно син-

тезировать маркер терминальной дифференцировки лорикрин, и через 24 ч уже 100% клеток лорикрин-позитивны. Дифференцировки можно избежать, если клетки в суспензии начнут формировать связи между  $\beta 1$ -интегрином и растворимым фибронектином, добавленным в культуральную среду. Таким образом, удержание в недифференцированном состоянии напрямую зависит от наличия сигнала от  $\beta 1$ -интегрина, связанного с фибронектином. Кроме этого, показано, что ламинин V и коллаген IV также образуют связи с  $\beta 1$ -интегрином, но в отсутствие фибронектина не способны останавливать процесс дифференцировки (Watt et al., 1993).

Кроме того, перевод кератиноцитов в суспензию может сопровождаться также и апоптозом — апоптозом, вызванным откреплением клеток от матрикса. Данный механизм описан в работе Реджинато (Reginato et al., 2003), авторы которой установили, что сигнал от интегрин, связанного с белками матрикса, влияет на сохранение экспрессии EGFR (рецептор одного из основных митогенов) кератиноцитов, находящихся в суспензии. Было показано, что присутствие в суспензии молекул ВКМ (Matrigel) сохраняет экспрессию EGFR на определенном уровне, при этом блокирование  $\beta 1$ -интегрин моноклональными антителами приводит к снижению уровня экспрессии EGFR (Reginato et al., 2003) точно так же, как открепление кератиноцитов от ВКМ (Grassian et al., 2011), причем сигналом к дифференцировке является не соотношение связанных и несвязанных молекул  $\beta 1$ , а абсолютное число связанных с ВКМ молекул  $\beta 1$ -интегринов (здесь имеет место дозозависимый эффект взаимодействия  $\beta 1$ -интегрин с белками матрикса). От уровня экспрессии EGFR напрямую зависит синтез проапоптотического белка Vim. В норме EGF подавляет экспрессию Vim, а значит и процесс апоптоза. Однако в процессе апоптоза, несмотря на присутствие в среде молекул EGF, авторы видели неуклонный рост экспрессии Vim. Как выяснилось, к 24 ч нахождения кератиноцитов в суспензии значительно снижалась экспрессия EGFR, соответственно сигнал от EGFR, связанного с EGF, не блокировал синтез Vim. Кроме того, повышение экспрессии Vim напрямую зависело от нарушения связи интегрин  $\beta 1$  с матриксом: при добавлении антител, блокирующих  $\beta 1$ -интегрин, наблюдалось повышение экспрессии Vim в кератиноцитах, находившихся в суспензии, даже в присутствии молекул ВКМ в среде (Reginato et al., 2003). Здесь, по-видимому, происходило конкурентное ингибирование между антителами и фибронектином за молекулу  $\beta 1$ -интегрин.

Что касается криохранения кератиноцитов в суспензии, оно приводит к увеличению доли клеток в состоянии апоптоза (Borderie et al., 1998; Xiao, 2003; Heng, 2006), то есть усугубляет процес-

сы, которые запускаются в кератиноцитах при переводе их в суспензию.

В работе Тиберио (Tiberio et al., 2002) показано влияние концентрации  $\beta 1$ -интегрин кератиноцитов на вероятность включения в них механизма апоптоза. Авторы данной работы анализировали три группы кератиноцитов, отличавшиеся скоростью адгезии к коллагену IV типа. Исследование гибели клеток, проведенное методом TUNEL в этих трех группах, показало, что в первой группе, содержащей высокий процент  $\beta 1$ -интегрин-позитивных клеток, апоптоза практически не было. Авторы сделали вывод, что СК защищены от апоптоза благодаря, в первую очередь, их высокой адгезивности. Кроме того, было показано, что лиганд — связывающая способность  $\alpha 5\beta 1$ -интегрин (основной рецептор к фибронектину) снижается после перевода кератиноцитов в суспензию и к 24 ч  $\beta 1$ -интегрин полностью исчезает с поверхности кератиноцита, коммитированного к дифференцировке (Adams, 1990; Watt, 1993). Добавление антител к  $\beta 1$ -интегрину, предотвращающих его связывание с фибронектином, но не активирующих его, в первой и второй группах (СК — экспрессировали максимальный уровень  $\beta 1$ -интегрин — и ранние прогениторы) приводило к значительному усилению апоптоза в этих клетках (Tiberio, 2002). Таким образом, СК могут быть наиболее эффективной мишенью для снижения степени дифференцировки через  $\beta 1$ -интегрин сигналинг.

От чего же зависит судьба кератиноцита, находящегося в суспензии? И какие процессы — апоптоза или дифференцировки — доминируют в кератиноцитах при переводе их в суспензию?

Анализом процессов апоптоза и дифференцировки кератиноцитов в суспензии исследователи занимаются давно (Terskikh, Vasil'ev, 2005). Ранее считалось, что они протекают по различным механизмам и могут не зависеть один от другого (Mittra et al., 1997). Позднее представления о взаимосвязи апоптоза и терминальной дифференцировки в суспензии эволюционировали.

Как уже сказано выше, сигналом к дифференцировке кератиноцитов в суспензии является потеря контакта  $\beta 1$ -интегрин с ВКМ. В течение первых 4 часов кератиноциты необратимо выходят из клеточного цикла, в то время как лорикрин в клетках начинает появляться не раньше, чем через 10 часов нахождения в суспензии. Хорошо известно, что терминальную дифференцировку частично можно ингибировать антителами к  $\beta 1$ -интегрину (Adams et al., 1989; Watt et al., 1993), однако важно понимать, что не все антитела к  $\beta 1$ -интегрину обладают способностью блокировать дифференцировку. В работе Ватт (Watt et al., 1993) исследователи экспериментировали с разными типами антител к  $\beta 1$ -интегрину (они использовали две группы моноклональных антител: блокирую-

щих и не блокирующих связь  $\beta 1$ -интегрин с белками ВКМ (фибронектином, ламинином и коллагеном IV)) и обнаружили, что только антитела из первой группы к субъединице  $\beta 1$  способны остановить дифференцировку в суспензии. Кроме этого, антитела из первой группы к гетеродимерам  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$  также были способны существенно блокировать дифференцировку. Таким же эффектом обладали антитела первой группы к субъединицам  $\alpha 3$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ , применяемые в комплексе с антителами к  $\beta 1$ . Это подтвердилось тем, что коллаген IV и ламинин (лиганды к  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$ ) блокировали дифференцировку лишь в комплексе с фибронектином (Dargibère et al., 1990; Watt et al., 1991). Эффективность антител первой группы была дозозависимой: лишь взятые в концентрации 250 мкг/мл они блокировали дифференцировку с эффективностью, близкой к фибронектину (Watt et al., 1993), что может указывать на чувствительность дифференцировки к количеству активированных субъединиц  $\beta 1$ . Однако стоит отметить, что даже сам фибронектин не был способен полностью блокировать дифференцировку в кератиноцитах, переведенных в суспензию. Авторы объясняют это тем, что связываясь с молекулой интегрин на поверхности клетки, фибронектин в то же время не предотвращает ингибирование внутриклеточного транспорта предшественников интегрин  $\beta 1$ , а также не снимает блок гликозилирования  $\beta 1$ -интегрин. Кроме того, добавление фибронектина не предотвращает снижение экспрессии белков, участвующих в формировании фокальных контактов наряду с интегринами ( $\beta$ -актин, филламин,  $\alpha$ -актинин), при переводе кератиноцитов в суспензию. Антитела из второй группы не блокировали процесс дифференцировки, даже взятые в высокой концентрации.

Именно разрыв связи  $\beta 1$ -интегрин с фибронектином стимулирует запуск в кератиноцитах процессов терминальной дифференцировки (Levy et al., 2000; Watt et al., 2002) и апоптоза (Stupack et al., 2001). В работе Джейнс (Janes et al., 2009) авторы показали, что включение этих процессов происходит в кератиноцитах практически одновременно и сопровождается активацией сигнального пути дифференцировки PI3K/Akt и апоптотического пути Caspase-8. Как известно, киназа PI3K может быть активирована белками Ras (Erk/MAPK-путь) и посредством других сигнальных путей (VEGFR, цитокины, инсулин). При помощи трансфекции кератиноцитов ретровирусным вектором, авторы вводили активируемый тамоксифеном (4-ОНТ) ген Akt (myrAktER) и показали, что *in vitro* PI3K/Akt-путь включается при переходе кератиноцитов из стволового компартмента в супрабазальные слои. Это было подтверждено с использованием двойной окраски антителами к Akt и  $\beta 1$ -интегрину *in vivo*. Авторы обнаружили актива-

цию PI3K/Akt пути в супрабазальных слоях эпидермиса, в то время как клетки базального слоя, активно экспрессировавшие  $\beta 1$ -интегрин, были отрицательны по Akt. На основании этих экспериментов сделан вывод о том, что включение PI3K пути происходит на начальных стадиях дифференцировки (в зернистом и роговом слоях клетки были Akt негативны). Применение ингибиторов PI3K (LY294002) приводило к остановке терминальной дифференцировки в суспензии. Кроме того, процесс активации каспаз возможно было остановить при формировании связи  $\beta 1$ -интегрин-фибронектин и внесении ингибитора PI3K, что говорит о том, что PI3K/Akt осуществляет регуляцию каспазного пути. Между сигнальными путями PI3K/Akt и Caspase-8 существует обратная связь: активация каспаз приводит к снижению фосфорилирования Akt. Чтобы проанализировать вклад каспазного пути в стимуляцию кератиноцитов к дифференцировке в суспензии, авторы использовали ингибитор к широкому спектру каспаз z-VAD-fmk, а также специфические ингибиторы двух основных путей апоптоза — Caspase-8 и Caspase-9-зависимых. Выяснилось, что терминальная дифференцировка блокируется во всех трех случаях, но ингибитор Caspase-8 (z-IETD-fmk) так же эффективен, как z-VAD-fmk, в то время как ингибитор Caspase-9 (z-LEHD-fmk) блокирует дифференцировку только частично (Janes et al., 2009).

Переводя кератиноциты в суспензию и подвергая их травме криохранения, мы неизбежно нарушаем механизмы сигналинга, ответственные за сохранение жизнеспособности и степени дифференцировки этих клеток. Находясь в суспензии, кератиноциты стремительно теряют способность к адгезии, поскольку экспрессия интегринов, в частности  $\beta 1$ -интегрин, постоянно снижается. Задача — приостановить процесс необратимого выхода кератиноцитов из клеточного цикла и сохранить максимальное количество  $\beta 1$ -интегрин-позитивных клеток в культуре. Мы предполагаем, что замедляя процессы терминальной дифференцировки разными путями — добавляя растворимый фибронектин, а также ингибиторы к PI3-kinase и Caspase-8, в среду для разморозки — возможно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, стволовых клеток после криохранения кератиноцитов в суспензии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект № 21-74-30015).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adams J.C., Watt F.M.* Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes // *Nature*. 1989. V. 340(6231). P. 307–309.
- Adams J.C., Watt F.M.* Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface // *Cell*. 1990. V. 63(2). P. 425–435.
- Averill-Bates D.A., Yee M.C.-S., Grondin M. et al.* Cryopreservation of rat hepatocytes with wheat proteins: Role in oxidative stress protection // *Cryobiol.* 2014. V. 69(3). P. 512–513.
- Bagutti C., Wobus A.M., Fässler R. et al.* Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells // *Dev. Biol.* 1996. V. 179(1). P. 184–196.
- Borderie V.M., Lopez M., Lombet A. et al.* Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. V. 39(8). P. 1511–1519.
- Danilkovitch-Miagkova A., Angeloni D., Skeel A. et al.* Integrin-mediated RON growth factor receptor phosphorylation requires tyrosine kinase activity of both the receptor and c-Src // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275(20). P. 14783–14786.
- Darribère T., Guida K., Larjava H. et al.* In vivo analyses of integrin beta 1 subunit function in fibronectin matrix assembly // *J. Cell Biol.* 1990. V. 110(5). P. 1813–1823.
- De Luca M., Pellegrini G., Green H.* Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts // *Regen. Med.* 2006. V. 1. P. 45–57.
- Evans R.D., Perkins V.C., Henry A., et al.* A tumor-associated beta 1 integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control // *J. Cell Biol.* 2003. V. 160(4). P. 589–596.
- Grassian A.R., Schafer Z.T., Brugge J.S.* ErbB2 stabilizes epidermal growth factor receptor (EGFR) expression via Erk and Sprouty2 in extracellular matrix-detached cells // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286(1). P. 79–90.
- Haase I., Hobbs R.M., Romero M.R., et al.* A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 527–536.
- Hanahan D., Weinberg R.A.* The hallmarks of cancer // *Cell*. 2000. V. 100(1). P. 57–70.
- Heng B.C., Ye C.P., Liu H., Toh W.S. et al.* Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis // *J. Biomed. Sci.* 2006. V. 13(3). P. 433–445.
- Hertle M.D., Adams J.C., Watt F.M.* Integrin expression during human epidermal development *in vivo* and *in vitro* // *Development*. 1991. V. 112(1). P. 193–206.
- Janes S.M., Ofstad T.A., Campbell D.H. et al.* PI3-kinase-dependent activation of apoptotic machinery occurs on commitment of epidermal keratinocytes to terminal differentiation // *Cell Res.* 2009. V. 19(3). P. 328–339.
- Jackson C., Aabel P., Eidet J.R. et al.* Effect of storage temperature on cultured epidermal cell sheets stored in xenobiotic-free medium // *PLoS One*. 2014. V. 9(8). P. e105808.
- Levy L., Broad S., Diekmann D. et al.* b1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms // *Cell*. 2000. V. 11. P. 453–466.
- Metral E., Bechetoille N., Demarne F. et al.*  $\alpha 6$  integrin ( $\alpha 6$ high)/transferrin receptor (CD71) low keratinocyte stem cells are more potent for generating reconstructed skin epidermis than rapid adherent cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18(2). P. e282.
- Moro L., Venturino M., Bozzo C. et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival // *EMBO J.* 1998. V. 17(22). P. 6622–6632.
- Miranti C., Brugge J.* Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction // *Nat. Cell Biol.* 2002. V. 4(4). P. e83–90.
- Meryman H.T.* Cryopreservation of living cells: principles and practice // *Transfusion*. 2007. V. 47(5). P. 935–945.
- Mitra R.S., Wrone-Smith T., Simonian P. et al.* Apoptosis in keratinocytes is not dependent on induction of differentiation // *Lab. Invest.* 1997. V. 76(1). P. 99–107.
- Muller P., Aurich H., Wenkel R. et al.* Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes // *Cell Tiss. Res.* 2004. V. 317(1). P. 45–56.
- Naaldijk Y., Friedrich-Stöckigt A., Sethe S. et al.* Comparison of different cooling rates for fibroblast and keratinocyte cryopreservation // *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* 2016. V. 10(10). P. e354–e364.
- Pasch J., Schiefer A., Heschel I. et al.* Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers // *Cryobiol.* 2000. V. 41(2). P. 89–96.
- Rama P. et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. P. 147–155.
- Rao B.S., Mahesh Y.U., Charan K.V. et al.* Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes // *Cryobiol.* 2012. V. 64(3). P. 176–184.
- Rippa A.L., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. et al.* The role of integrins in the development and homeostasis of the epidermis and skin appendages // *Acta Naturae*. 2013. V. 5(4). P. 22–33.
- Reginato J., Mills K.R., Paulus J.K. et al.* Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5(8). P. 733–740.
- Soldi R., Mitola S., Strasly M. et al.* Role of  $\alpha v \beta 3$  integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 // *EMBO J.* 1999. V. 18(4). P. 882–892.

- Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S. et al.* Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins // *J. Cell Biol.* 2001. V. 155(3). P. 459–470.
- Tiberio R., Marconi A., Fila C. et al.* Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner // *FEBS Lett.* 2002. V. 524(1–3). P. 139–144.
- Terskikh V.V., Vasiliev A.V.* Apoptosis and differentiation of epidermal keratinocytes // *Rus. J. Develop. Biol.* 2005. V. 36. P. 61–64.
- Watt F.M.* Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation // *EMBO J.* 2002. V. 21(15). P. 3919–3926.
- Watt F., Kubler M.D., Hotchin N.A. et al.* Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions // *J. Cell Sci.* 1993. V. 106. P. 175–182.
- Woelders H., Chaveiro A.* Theoretical prediction of optimal freezing programmes // *Cryobiol.* 2004. V. 49. P. 258–271.
- Xiao M., Dooley D.C.* Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage // *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003. V. 12(1). P. 115–122.
- Zhu A.J., Haase I., Watt F.M.* Signaling via b1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. V. 96. P. 6728–6733.

## Problem of Terminal Differentiation and Apoptosis during Human Keratinocytes Cryostorage in Suspension

A. N. Popova<sup>1, \*</sup> and E. A. Vorotelyak<sup>1, 2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Development Biology RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119234 Russia*

*\*e-mail: popova.anna.n@gmail.com*

*\*\*e-mail: vorotelyak@yandex.ru*

Cryostorage of human epidermal keratinocytes is an essential stage in living epidermal equivalent manufacturing. However cryostorage of keratinocytes in suspension stimulates processes of terminal differentiation and apoptosis leading to massive loss of stem and progenitor keratinocytes. Suspension-induced signal of disruption between  $\beta$ 1-integrin and extracellular matrix causes simultaneous activation of PI3K/Akt- and Caspase-8 pathways. We assumed that terminal differentiation could be blocked by fibronectin, PI3-kinase, and Caspase-8-inhibitors added to culture medium after cryostorage in suspension.

*Keywords:* keratinocytes, cryostorage, differentiation, apoptosis

В память наших учителей О.Г. Строевой и В.И. Миташова

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРАТЕГИИ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ У АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VIVO*

© 2021 г. Э. Н. Григорян<sup>а</sup>, \*, Ю. В. Маркитантова<sup>а</sup>, \*\*

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

\*e-mail: leonore@mail.ru

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

Поступила в редакцию 08.03.2021 г.

После доработки 28.03.2021 г.

Принята к публикации 31.03.2021 г.

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) является клеточным источником регенерации сетчатки у амфибий *in vivo* и развития заболеваний сетчатки у млекопитающих и человека. В основе обоих процессов лежит трансдифференцировка клеток РПЭ – превращение в клетки иных фенотипов: в первом случае нейральные, во втором – мезенхимные. В обзоре описаны основные этапы трансдифференцировки клеток РПЭ: инициация процесса, миграция и пролиферация клеток, дедифференцировка, репрограммирование и специализация клеток в новых направлениях. Приведена информация о молекулярно-генетических механизмах, обеспечивающих прохождение клетками этих этапов. Представлены молекулярные участники регуляции трансдифференцировки со стороны целого организма, локального клеточного микроокружения (ростовых факторов, сигнальных каскадов), экспрессии транскрипционных факторов, а также регуляции со стороны эпигенома. Отмечены сходства и отличия в молекулярно-генетических механизмах реализации различающихся стратегий трансдифференцировки РПЭ у амфибий и млекопитающих. Обнаружение молекулярных ключевых участников этого выбора служит как развитию теории клеточного репрограммирования, так и разработке подходов для лечения пролиферативных заболеваний сетчатки человека, ассоциированных с патологиями РПЭ.

**Ключевые слова:** глаз, сетчатка, пигментный эпителий, трансдифференцировка, регенерация, пролиферативная ретинопатия, факторы транскрипции, сигнальные молекулы, эпигеном

DOI: 10.31857/S0475145021040030

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- РПЭ – ретинальный пигментный эпителий
- НС – нейральная сетчатка
- ТФ – транскрипционный фактор
- ЭМП – эпителиально-мезенхимный переход
- ЭМ – эпиретинальная мембрана
- ПВР – пролиферативная витреоретинопатия
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ПЦР – полимеразная цепная реакция

### ВВЕДЕНИЕ

В нормальных, не патологических для тканей организма условиях, клетки взрослых позвоночных сохраняют стабильность дифференцировки. Изменение клеточной идентичности означало бы

невозможность для ткани сохранять свою целостность и должным образом функционировать в составе организма. Стабильность дифференцировки достигается посредством эпигенетической регуляции в совокупности с экспрессией транскрипционных факторов (ТФ). И то, и другое, в свою очередь, диктуется клеточным микроокружением и общеорганизменными регуляторными факторами (Holliday, 2006; Григорян, 2018; Basinski et al., 2021). Противоположными состоянию стабильности являются де- и трансдифференцировка клеток, широко исследуемые со времени открытия Дж. Гордоном (Gurdon, 1962) превращения дифференцированных зрелых клеток кишечного эпителия головастика в клетки со свойствами оплодотворенных ооцитов при трансплантации ядер. Пристальный интерес к изменениям клеточной идентичности у позвоночных в течение

полувека привел к накоплению данных, свидетельствующих о том, что подобное происходит в направленных лабораторных экспериментах, при патологии и болезнях, а также при регенерации (см. обзоры: Jopling et al., 2011; Merrell, Stanger, 2016). У взрослых рыб и амфибий процессы клеточных де- и трансдифференцировки лежат в основе регенерации утраченных или поврежденных тканей и органов (Alvarado, Tsonis, 2006; Jobling et al., 2010).

Ярчайшими, ставшими классическими, примерами регенерации посредством трансдифференцировки является восстановление сетчатки и хрусталика из клеток пигментированных эпителиев глаза *Urodela* (Okada, 1980, 1991; Eguchi, 1986). Эти модели на протяжении многих лет многосторонне исследовались. Основными этапами были: изучение клеточного поведения, морфологии клеток, динамики пролиферации, изменений общих и специфических синтезов, изменений микроокружения и молекул надклеточной и внутриклеточной регуляции процесса, и наконец, исследования молекулярно-генетического паттерна экспрессии генов. Причиной столь масштабных исследований было стремление максимально раскрыть внутри- и внеклеточные механизмы, лежащие в основе тканевой и органной регенерации у позвоночных животных. Понимание трансдифференцировки на клеточном и молекулярном уровнях приближало разработку способов лечения заболеваний, при которых конверсия клеточного типа играет ключевую роль, а также формировало основу для биотехнологического воспроизводства условий, стимулирующих регенерацию тканей глаза у млекопитающих и человека.

В лабораториях ИБР РАН, благодаря профессорами О.Г. Строевой и В.И. Миташову, создавшим и обогатившим направление исследований развития и регенерации тканей глаза в норме и патологии, особое внимание уделялось модели регенерации сетчатки за счет клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) у *Urodela* (Stroeva, Mitashov, 1983; Mitashov, 1996, 1997). Параллельно в мире изучался вопрос пролиферативных заболеваний и эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) клеток РПЭ сетчатки глаза млекопитающих и человека. В частности, изучались молекулярные механизмы процессов пролиферации и конверсии клеток РПЭ в мезенхимном направлении, приводящие к развитию пролиферативной витреоретинопатии (ПВР, PVR) (Morescalchi et al., 2013; Idrees et al., 2019; Zou et al., 2020), а также таких заболеваний как пролиферативная диабетическая ретинопатия (Abu El-Rasral, 2013) и субретиальный фиброз (Lopez et al., 1996).

В статье обобщен ряд ключевых, полученных ранее, и современных сведений, раскрывающих

явление трансдифференцировки на примере конверсии клеток РПЭ глаза у амфибий и млекопитающих. Две различающиеся стратегии изменений дифференцировки РПЭ – в нейральном направлении у амфибий и мезенхимном у млекопитающих – находятся под многоуровневым регуляторным контролем, коротко освещенном в данном обзоре. Обсуждаются вопросы времени и условий выбора клетками РПЭ разных молекулярных стратегий для конверсии в разных направлениях. Внимание уделено вопросу генетического и эпигенетического состояний клеток РПЭ на ключевом этапе трансдифференцировки – при входе клеток в пролиферативный цикл и фазу репрограммирования генома.

### РЕТИНАЛЬНЫЙ ПИГМЕНТНЫЙ ЭПИТЕЛИЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

РПЭ взрослых позвоночных является высоко-специализированной тканью – эпителиальным монослоем пигментированных, поляризованных клеток, с характерными и общими для всех изученных позвоночных чертами. РПЭ расположен между нейральной сетчаткой (НС) и ее васкулярным слоем, снабжающим НС необходимыми веществами и кислородом (Панова, 1993; Strauss, 2005; Fuhrmann, 2014) (рис. 1а). Помимо переноса веществ по базально-апикальному градиенту клеток, РПЭ выполняет ряд важных функций, производя факторы и сигнальные молекулы, поддерживающие гомеостаз и нормальное функционирование сетчатки (Strauss, 2005; Sparrow et al., 2010). При этом основной функцией РПЭ является фагоцитоз слущивающихся наружных сегментов фоторецепторов НС, а затем их переваривание с помощью лизосом. Это позволяет фоторецепторам синтезировать новые отростки для световосприятия, обеспечивает жизнеспособность клеток и метаболизм ретиноидов. До сих пор, несмотря на определенную гетерогенность клеточной популяции РПЭ, нет сведений о наличии в нативном его слое *in situ* стволовых или прогениторных клеток (Burke et al., 1996; Burke, Hjelmeland, 2005; Strauss, 2005).

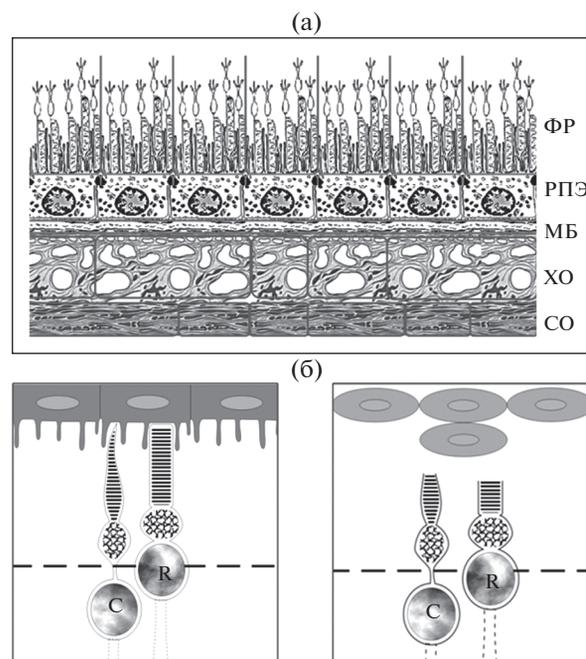
### ДЕ- И ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК РПЭ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ

Термин дедифференцировка предполагает возврат дифференцированной клетки в состояние с большим потенциалом развития, близким таковому у стволовых и прогениторных клеток. Наиболее ярким примером является получение индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК) из культивируемых эмбриональных и зрелых фибробластов мыши *in vitro* посредством создания условий для сверхэкспрессии в них ряда ТФ: Oct4,

Sox2, Klf4 и с-мус (OSKM) (Takahashi, Yamanaka, 2006). Среди других, менее известных примеров, выявлен ТФ MyoD, экспрессия которого после трансфекции гена, способствует превращению клеток РПЭ, а также фибробластов и хондроцитов в мышечные клетки *in vitro* (Davis et al., 1987; Tapscott et al., 1987; Weintraub et al., 1989; Tapscott, Weintraub, 1991). *In vivo* явление дедифференцировки показано для различных тканей амфибий, а также высших позвоночных после повреждения и в условиях патологии (Szibor et al., 2014; Yao, Wang, 2020).

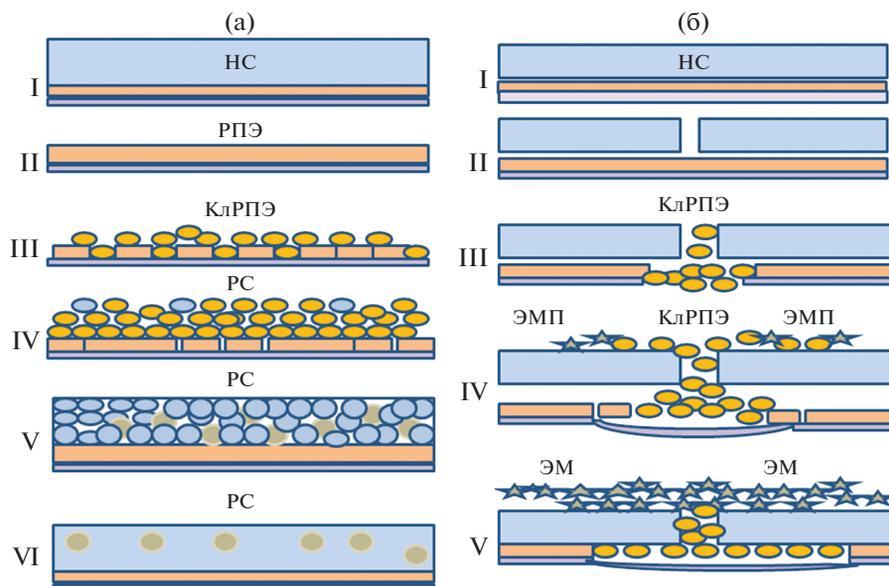
“Трансдифференцировка” – термин, вошедший в научный обиход в 60–70-х годах прошлого столетия (Weissenfels, Hundgen, 1968; Okada, 1975; Eguchi, 1979). Исходно он отражал превращение полностью дифференцированного клеточного типа в иной, также дифференцированный тип, минуя промежуточный этап – дедифференцировку (Mills et al., 2019). Позже термин “трансдифференцировка” утвердился как подразумевающий по умолчанию наличие промежуточного состояния, необходимого для потери клетками исходных фенотипических черт, пролиферации и возникновения черт другого клеточного типа (Okada, 1980). Трансдифференцировка является глубокой реорганизацией клетки на всех уровнях – от транскрипционного до морфогенетического (при формировании *de novo* ткани из претерпевших конверсию клеток). В этой связи внеклеточные сигналы, регулирующие процесс трансдифференцировки, должны работать координированно, носить четкий пространственно-временной характер. Многие из регулирующих факторов известны (см. ниже), однако, картина их динамической сети *in vivo* еще далека до полной. В настоящее время предполагается, что работа ТФ и регулируемый эпигенетический ландшафт, способные активировать или подавлять ту или иную программу экспрессии генов, лежат в центре событий трансдифференцировки (Powell, 2013; Merell, Stanger, 2018; Grigoryan, 2020; Vanden Bosch, Reh, 2020).

Таким образом, при трансдифференцировке имеет место смена “клеточной идентичности” (“cell identity”), определяемой в разное время с разной степенью точности. Традиционно специфические клеточные типы определяли, используя морфологические критерии. Позже выяснилось, что этого недостаточно: невидимая морфологически, но присутствующая на других уровнях изучения гетерогенность, как исходной ткани, так и формирующейся в ходе трансдифференцировки, требовала уточнений. В нативном РПЭ выявлены региональные отличия в экспрессии структурных молекул (Schmidt, Peisch, Burke et al., 1996; Burke, Hjelmeland, 2005; Durairaj et al., 2012) и в способности к пролиферации в слое (Строева, 1971; Al-Hussaini et al., 2008; Григорян, 2015). При ЭМП клетки РПЭ млекопитающих тоже имеют



**Рис. 1.** Схематическое изображение ретинального пигментного эпителия во взаимодействии с окружающими тканями задней стенки глаза позвоночных животных. (а) – нормальный глаз. ФР – фоторецепторы, РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; МБ – мембрана Бруха; ХО – хороидальная оболочка; СО – склеральная оболочка. (б) – разобщение ретинального пигментного эпителия с фоторецепторными клетками сетчатки (справа) по сравнению с нормальным состоянием (слева). С – колбочки (cones); R – палочки (rods).

отличия по степени проявления мезенхимного фенотипа как *in vitro*, так и в ходе ПВР и других пролиферативных заболеваний сетчатки (Chhtchevlova et al., 2020). Важным этапом стало применение иммунохимических и молекулярных методов, способных выявить локализацию и уровень экспрессии генов, отвечающих за синтез структурных белков, ТФ и сигнальных молекул. В последнее время стало возможным изучение геномов и транскриптомов представителей Urodela-объектов исследования трансдифференцировки (Bruckskotten et al., 2012; Nakamura et al., 2014; Nowoshilow et al., 2018; Biscotti et al., 2020); получило развитие изучение эпигенома клеток глаза позвоночных (Aldiri et al., 2017; Corso-Diaz et al., 2018; Dvorianchikova et al., 2019). Арсенал современных подходов и методов отсутствовал на этапе морфологических исследований трансдифференцировки, однако, именно тогда О.Г. Строевой и В.И. Миташовым в основу направления работы было заложено представление о “переключении работы генов”, как основополагающем событии конверсии клеточного типа (Строева, Миташов, 1970; Stroevea, Mitashov, 1981). Это позволило со временем вывести решение проблемы трансдиф-



**Рис. 2.** Последовательные стадии регенерации сетчатки у амфибий (а) и развития пролиферативной ретинопатии у млекопитающих (б). НС – нейральная сетчатка; РПЭ – ретиальный пигментный эпителий; КлРПЭ – трансдифференцирующиеся клетки РПЭ; РС – регенерат сетчатки; ЭМП – эпителиомезенхимный переход; ЭМ – эпиретинальная мембрана.

ференцировки на уровень изучения ее молекулярных механизмов и регуляции *in vivo*.

### ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК РПЭ У ВЗРОСЛЫХ АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VIVO*

РПЭ хвостатых амфибий (Urodela) обладает способностью к регенерации сетчатки и дает яркий пример естественной конверсии в ретиальные клетки *in vivo*. После повреждений глаза (отслойки сетчатки, ее удаления, перерезки зрительного нерва) РПЭ становится источником воспроизводства новой сетчатки (Stone, 1950; Hasegawa, 1958; Keefe, 1973; Stroeveva, Mitashov, 1983; Mitashov, 1996, 1997; Chiba, Mitashov, 2007; Yasumuro et al., 2017) (рис. 2а). Основными событиями процесса трансдифференцировки являются: выход клеток из слоя РПЭ, потеря исходных черт и свойств (дифференцировка), амплификация, формирование промежуточной популяции пролиферирующих нейробластов, выход их из цикла репродукции и дифференцировка ретиальных клеточных типов. Потенции клеток РПЭ в качестве клеток-источников для восстановления сетчатки обнаружены и у взрослых бесхвостых амфибий, лягушек *X. laevis* (Свистунов, Миташов, 1983). Позже показано, что при сохранении ограничивающей внутренней край сетчатки васкулярной мембраны в ходе удаления исходной сетчатки, клетки РПЭ покидают слой, мигрируют, осев на мембране пролиферируют и формируют регенерат так же, как это

происходит у Urodela (Yoshii et al., 2007; Araki et al., 2007).

У человека, как и у амфибий, в ответ на повреждение сетчатки клетки РПЭ теряют свои эпителиальные характеристики, вымещаются из слоя, мигрируют и пролиферируют, трансдифференцируясь при этом в мезенхимные клетки, подобные миофибробластам; при движении за пределы сетчатки они избегают клеточной гибели и синтезируют компоненты ВКМ, участвуя в формировании эпиретинальной мембраны (ЭМ) (рис. 2б) (Kirchhof, Sorgente, 1989; Abe et al., 1998; Tamiya et al., 2010; Wu et al., 2018). Образование ЭМ в ответ на повреждение НС (чаще разрыв и отслойку) приводит к сокращению ЭМ вместе с НС, что вызывает снижение зрения. Описаны этапы процесса и их регуляция (Garweg et al., 2013; Tamiya, Kaplan, 2016; Zou et al., 2020). ЭМП клеток РПЭ млекопитающих может иметь место не только при патологиях (заболеваниях) глаза, но и в процессе восстановления слоя, например, после воздействия лазером (Han et al., 2015). Превращения клеток РПЭ млекопитающих *in vivo* при ЭМП подпадает под определение “трансдифференцировка”, хотя встречаются и другие определения, например, “дисфункция РПЭ” (Zhou et al., 2020).

Большая информация, свидетельствующая о возможности трансдифференцировки клеток РПЭ млекопитающих и человека накоплена в результате экспериментов *in vitro*. Исследования свидетельствуют о проявлении клетками РПЭ свойств мультипотентных. РПЭ взрослых грызу-

нов (Engelhardt et al., 2005) и человека (Милюшина и др., 2009; Milyushina et al., 2011, 2012; Li et al., 2019) в условиях *in vitro* в присутствии морфогенов и факторов роста демонстрирует пролиферацию, дедифференцировку и в некоторых случаях продукцию нейронов. На стадии дедифференцировки клетки РПЭ человека приобретают черты нейроэпителиальных клеток, экспрессируют гены *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *OTX2*, *PAX6* и *NESTIN* (Милюшина и др., 2009, 2011, 2012; Кузнецова и др., 2014). В работе Салеро и др. (Salero et al., 2012) показано, что клетки РПЭ человека *in vitro* способны не только к воспроизводству своего фенотипа и производству нейронов, но и клеток с признаками мезенхимных (адипо-, остео- и хондрогенной) дифференцировок. На линии клеток РПЭ человека ARPE-19 показано, что сигнальный путь Wnt является одним из регуляторов ЭМП (Chen et al., 2012). Все это позволило пересмотреть существовавший взгляд на то, что конверсия РПЭ может происходить только в пределах “возможностей глазного зачатка”, а именно в эктодермальном направлении. Все эти данные свидетельствуют о заложенной в РПЭ двойной компетенции. Молекулярные изменения в клетках культивированного РПЭ млекопитающих имеют сходство с событиями, происходящими в РПЭ амфибий при регенерации сетчатки *in vivo* (Engelhardt et al., 2005; Milyushina et al., 2012). Это указывает на консервативную молекулярно-генетическую природу механизмов трансдифференцировки РПЭ у низших и высших позвоночных.

### ИНИЦИАЦИЯ ПРОЦЕССА КЛЕТОЧНОЙ КОНВЕРСИИ В РПЭ АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Вопросы инициации конверсии клеток РПЭ у амфибий и у млекопитающих были подробно рассмотрены для определения сходства и отличий клеточных событий (обзоры: Grigoryan, 2012; Chiba, 2014). Установлено, что триггером трансдифференцировки является разобщение НС и РПЭ, в частности разрушение интерфоторецепторного матрикса (IPM), обеспечивающего взаимодействие между двумя тканями сетчатки и их жизнеспособность (Lazarus, Nagemann, 1992; Панова, 1994; Uehara et al., 2001) (рис. 16). Дезинтеграция является триггером событий, суммированных в общем виде в табл. 1. Ранние события после разобщения НС и РПЭ у позвоночных связаны с нарушениями редокс-гомеостаза, развитием окислительного стресса, запускающими в клетках воспалительную реакцию и иммунный ответ (Маркитантова, Смирский, 2020). На самых начальных этапах превращений клеток РПЭ существует большое сходство вне зависимости от того, что стало причиной разобщения РПЭ с НС, и какую стратегию клетки РПЭ выберут в даль-

нейшем – стать нейронами при регенерации НС у амфибий или приобрести мезенхимную дифференцировку при ЭМП у млекопитающих. В обоих случаях наблюдается дезинтеграция клеток в слое РПЭ, нарушение в системе контактов и межклеточных взаимодействий, изменения во взаимодействиях с подлежащими тканями, приобретение способности к миграции (обзоры: Grigoryan, 2012; Chiba, 2014). Имеют место реорганизация цитоскелета и композиции ВКМ на фоне изменений со стороны циркулирующей крови и иммунной системы. Все эти изменения, приводят к дестабилизации фенотипа РПЭ, фенотипической трансформации при выходе из слоя и миграции клеток. Параллельно происходит down-регуляция экспрессии молекул – компонентов зрительного цикла (Rattner et al., 2008; Garcia-Ramirez et al., 2009) и экспрессии белков специфичных для РПЭ (Chiba et al., 2006; Авдонин и др., 2008). В то же время имеет место up-регуляция экспрессии белков теплового шока (HSPs) (Faktorovich et al., 1992; Geller et al., 2001), ряда ростовых факторов (PEDF, VEGF, FGF, CNTF, IGF, TGF) и компонентов их сигнальных путей (обзор: Strauss, 2005; Abu El-Asrar et al., 2007; Chen et al., 2015; Fardjood, Vargis, 2017). Увеличивается экспрессия проапоптотических ферментов и генов быстрого реагирования на стресс (“immediate early response genes” и AP-1 complex) (Kaneko et al., 1999; Reme et al., 2003; Geller et al., 2001). Все связанные с разобщением РПЭ и НС события, и у амфибий, и у млекопитающих, можно расценивать как универсальные ответы на клеточный стресс (Rattner et al., 2008; Grigoryan, 2012). Тем не менее, помимо сходства и универсальности ранних клеточных реакций, участия сигнальных путей, действие которых направленно на защиту клетки от стресса, существуют эволюционно закрепленные функциональные особенности в стратегиях поведения клеток РПЭ у хвостатых амфибий и млекопитающих (Маркитантова, Смирский, 2020).

### ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА, КОНТАКТОВ И КОМПОНЕНТОВ ВКМ В ХОДЕ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК РПЭ АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Цитоскелет клеток РПЭ является отражением его эпителиальной и функциональной специализации, а также фенотипической пластичности. Мы исследовали состояние цитоскелета клеток РПЭ тритона *Pt. waltlii* в норме и в начале конверсии. Индукция к репрограммированию РПЭ путем изоляции НС (удаление, отслойка) приводит к ингибированию экспрессии цитокератинов в клетках, находящихся еще в слое РПЭ (Григорян, 1995; Григорян, Антон, 1995). То же наблюдалось при изоляции и диссоциации клеток РПЭ тритона, что было вызвано меняющимися условиями:

**Таблица 1.** Сходство основных событий и их клеточных и молекулярных последствий при нарушении связи клеток ретинального пигментного эпителия и нейральной сетчатки

Основные события при нарушении связи РПЭ и НС	Клеточные и молекулярные последствия инициации трансдифференцировки РПЭ <i>in vivo</i> у амфибий	Клеточные и молекулярные последствия инициации трансдифференцировки РПЭ при отслойке сетчатки у человека
Разрушение связи апикальных отростков РПЭ и фоторецепторов	Разрушение ИФМ, ослабление и потеря контактов между клетками РПЭ и связи с мембраной Бруха, выход клеток из слоя, потеря эпителиальной морфологии, вход в S-фазу клеточного цикла	Разрушение ИФМ, ослабление и потеря контактов между клетками РПЭ и связи с мембраной Бруха, выход клеток из слоя, потеря эпителиальной морфологии, вход в S-фазу клеточного цикла
Нарушение зрительного цикла, апоптоз части клеток в РПЭ и НС	Прекращение синтеза меланина, down-регуляция белков зрительного цикла и специфических белков РПЭ	Прекращение синтеза меланина, down-регуляция белков зрительного цикла и специфических белков РПЭ
Изменения в кровеносной и иммунной системах в задней стенке глаза	Активация фибринолитических компонентов крови (TF, thrombin) и системы комплемента (C3, C5)	Активация фибринолитических компонентов крови (tPA), белков и клеток воспаления
Активация ростовых факторов и сигнальных путей	FGF2, IGF1, TGFβ, MEK-ERK	PEDF, VEGF, FGF1,2, CNTF, BDNF, IGF1, TGFβ, MAPK-ERK
Up-регуляция экспрессии HSPs и генов раннего реагирования (immediate-early response genes)	HSPs 70, 90; <i>c-Myc</i>	HSPs, <i>c-Fos</i> , <i>c-Jun</i> , AP1-complex
Ремоделирование внеклеточного матрикса и цитоскелета РПЭ	Участие фибронектина, ламинина, тенасцина и N-CAM. Ингибирование цитокератинов и начало экспрессии белков нейрофиламентов (NF-200)	Участие ламинина и интегринов. Изменение композиции кадгеринов, цитокератинов, виментина и GFAP. Инициация экспрессии белков гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA)

потерей контактов клеток друг с другом, выстилающей РПЭ мембраной Бруха и фоторецепторами НС, т.е. с потерей трехмерного окружения. В то же время, в первых, выселяющихся из слоя и меняющих фенотип клетках РПЭ, инициировалась экспрессия пан-нейрального белка NF-200, при наличии в цитоплазме пигментных гранул (Григорян, Антон, 1993). В ходе развития популяции нейробластов (клеток потомков РПЭ) ее дифференцировки и морфогенеза белки NF-200 накапливались. Данные свидетельствуют о том, что замещение специфических белков цитоскелета РПЭ (цитокератинов на пан-нейральные белки) входит в программу трансдифференцировки. Высокая скорость переключения на считывание с генов, кодирующих белки NF-200, свидетельствует о лабильном состоянии системы регуляции экспрессии генов. Вопрос молекулярных изменений в системе клеточных контактов, мало изучен. Предварительные данные о локализации белков ZO (zonula occludens), ассоциированных с плотными контактами РПЭ, показали увеличение экспрессии ZO-1 и перераспределение по клеточным поверхностям РПЭ. По мере дальней-

шей миграции и дедифференцировки клеток РПЭ экспрессия белка ZO-1 снижалась, что вызвано полной потерей контактов и контактного ингибирования в слое РПЭ (Николаев, 2018). В стабилизации и пластичности клеточной дифференцировки существенную роль играет ВКМ (Hausman, 2007; Bonnans et al., 2014). Нами отмечены динамические изменения в локализации и экспрессии фибронектина (FN) в случае микрохирургической отслойки сетчатки у тритона. На 10-е сут иммунореакция FN-антигенов на обработку антителами снижалась на базальной поверхности, но усиливалась на латеральных поверхностях клеток РПЭ, входящих в это время в фазу пролиферации (Григорян и др., 1990). Те же закономерности в норме и процессе конверсии РПЭ тритона отмечены позже Ортизом и соавторами (Ortiz et al., 1992). Поскольку FN-адгезионный компонент мембраны Бруха и способствует прикреплению клеток РПЭ, снижение его содержания при конверсии можно рассматривать как явление, способствующее выходу клеток из слоя. На роль регуляторов трансдифференцировки РПЭ претендуют и другие компоненты ВКМ и

базальных мембран: тенасцин и N-CAM, также меняющие свою экспрессию в процессе конверсии РПЭ тритона (Mitashov et al., 1995). На раннем этапе трансдифференцировки РПЭ тритона, обнаружена ядерная транслокация бета-катенина ( $\beta$ -catenin) одновременно со снижением иммунореактивности N-Cad (N-кадгерина), что служит входу клеток в S-фазу (Yasumuro et al., 2017).

Состояние межклеточных контактов и ВКМ во многом определяют судьбу клеток РПЭ при пролиферативных заболеваниях сетчатки млекопитающих (Hiscott et al., 1999). Существенная роль в конверсии клеток РПЭ при ПВР принадлежит полипептиду ZO-1 и E-Cad (E-кадгерину), присутствующему в сайтах межклеточной адгезии. Белки обоих типов участвуют в формировании плотных контактов и адгезии, необходимых для сохранения эпителиальной дифференцировки и функции РПЭ (Stevenson et al., 1986; Lee et al., 2007). Внутриклеточным белком-маркером эпителио-мезенхимной дифференцировки, прежде всего, является сократительный белок  $\alpha$ -SMA (гладкомышечный актин альфа), обеспечивающий клеточную подвижность РПЭ. Кроме того, присутствует виментин (Vim), играющий важную роль в стабилизации структуры мигрирующих клеток. Продуцируемый клетками FN является маркерным белком фиброза при формировании ЭМ, необходимым для депонирования микрофибрилл (Lee et al., 2007; Zou et al., 2020). В результате перестройки межклеточных контактов, подвергающийся ЭМП РПЭ приобретает мезенхимоподобный фенотип, характеризующийся усиленной экспрессией белков цитоскелета (Vim,  $\alpha$ -SMA), повышенным отложением белков ВКМ, включая коллаген и фибронектин (Imamichi, Menke, 2007). В процессе ЭМП в РПЭ *in vivo* происходит снижение экспрессии десмоплакина, белков промежуточных филаментов и других компонентов участвующих в формировании десмосом. Процесс сопровождается также сменой паттерна экспрессии цитокератинов, свойственных нативному РПЭ (цитокератины 8 и 18) (Sheridan et al., 2005), заменяются цитокератинами 7 и 19, усиливается экспрессия коллагена I типа и FN (Philp, Nachmias, 1987; Kigasawa et al., 1998). Фенотипические изменения РПЭ при ЭМП и миграции включают снижение экспрессии эпителиальных маркеров ZO-1 и E-Cad, и увеличение экспрессии мезенхимных маркеров —  $\alpha$ -SMA, Vim, и FN (Lee et al., 2007). Для мыши показано увеличение активности ТФ ZONAB и снижение ZO-1 при изменении фенотипа РПЭ от пигментированного эпителиального к фибробластоподобному (Georgiadis et al., 2010).

## ПРОЛИФЕРАЦИЯ, КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРОЦЕССА КОНВЕРСИИ КЛЕТОК РПЭ У АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В изучении пролиферативных процессов в РПЭ в развитии глаза и при клеточной конверсии большой вклад внесен О.Г. Строевой и В.И. Миташовым (Строева, 1962; Stroevea, Mitashov, 1983; Миташов, 1969а, 1969б, 1970, 1974). С помощью импульсного мечения  $^3\text{H}$ -тимидином у тритонов *T. vulgaris* в нативном РПЭ удалось выявить до 3% синтезирующих ДНК клеток (Григорян, Миташов, 1979). Позже при использовании метода долговременной доставки аналога тимидина — бромдезоксигуанидина (BrdU), а также при многократном введении  $^3\text{H}$ -тимидина, наличие в РПЭ тритонов редких клеток в фазе синтеза ДНК подтвердилось (Новикова и др., 2008). Пролиферация клеток нативного РПЭ характеризовалась длинным S-периодом и крайне редкими митозами. Есть данные, свидетельствующие о присутствии пролиферирующих клеток в РПЭ млекопитающих (Al-Hussaini et al., 2008; Stern, Temple, 2015). Отмечено, что медленно пролиферирующие клетки в слое РПЭ позвоночных в норме и при повреждении локализованы на периферии — области наиболее позднего созревания этой ткани (Строева, 1971; Синицина, 1971; Миташов, 1974; Kiilgaard et al., 2007). У тритона пролиферация в РПЭ инициируется на первой неделе после разобщения его с клетками НС, затем возрастает и в течение 2 нед. держится на высоком уровне. Параллельным событием является прекращение синтеза меланина и все более углубляющаяся дедифференцировка (Григорян, Миташов, 1979). В ходе амплификации для клеток РПЭ показаны уменьшение времени клеточного цикла и изменения его параметров: сокращение  $G_1$  и увеличение S-фазы (Миташов, 1969б; Stroevea, Mitashov, 1983). Выяснено также, что у тритона для проявления первых черт специализации в регенерате сетчатки клеткам нужно пройти 6–7 делений, что свидетельствует о необходимости накопления определенной численности клеток в бластеме сетчатки для окончательного приобретения клетками новых черт — нейрональной и глиальной дифференцировок (Миташов, 1970; Mitashov, 1980). Позже сделаны попытки выявления молекулярного механизма входа клеток РПЭ в S-фазу клеточного цикла, вызванного разобщением РПЭ и НС (Mizuno et al., 2012; Yoshikawa et al., 2012; Yasumuro et al., 2017). Мизуно и соавторы исследовали активацию MEK–ERK-каскада в РПЭ *in vivo* после удаления НС (Mizuno et al., 2012). Активация сигнального пути была выявлена через 30 мин после ретинэктомии. Изменения активности пути MEK–ERK изучали при кратковременном культивировании РПЭ в составе задней стенки глаза тритона (Yoshikawa et al., 2012). От-

мечены основные составляющие этого события: высвобождение клеток РПЭ из-под влияния контактного ингибирования, MEK–ERK, гепарин-зависимый сигнальный путь. По мнению авторов, активация MEK–ERK происходит за счет up-регуляции сигнального пути по механизму положительной обратной связи. Данные свидетельствуют о том, что клетки РПЭ тритона обладают механизмом быстрого запуска индуцирующего пролиферацию сигнального каскада и о поддержании его в активированной форме еще в течение 7–10 дней (Mizuno et al., 2012; Yoshikawa et al., 2012).

Вопрос пролиферативной активности РПЭ млекопитающих и человека подробно рассмотрен в обзоре (Stern, Temple, 2015). Раннее созревание и стабилизация дифференцировки РПЭ, а также численности популяции в норме *in vivo* определяют возможность крайне редких митотических делений (Строева, 1961). Однако ситуация меняется если дифференцировка РПЭ дестабилизирована разобщением с НС, при патологиях, а также в условиях *in vitro* в результате воздействий со стороны вносимых в среду ростовых факторов. У человека, как указано выше, индукция пролиферации *in vivo* чаще всего сопровождается ЭМП и возникновением мезенхимных клеток (Casaroli-Marano et al., 1999; Tamiya et al., 2010). В ряде других случаев, таких, например при возраст-зависимой макулярной дегенерации, пролиферация – нечастое событие и не приводит к восполнению слоя РПЭ после гибели части его клеток (Stern, Temple, 2015).

Пролиферативная активность РПЭ млекопитающих и человека изучалась *in vitro* (Flood et al., 1980; Stern, Temple, 2015). Отмечено, что активный рост РПЭ *in vitro* чаще всего приводит к появлению клеток, различающейся морфологии в спектре от эпителиальных до фибробластоподобных (Tamiya et al., 2010; Милюшина и др., 2011). Пролиферация сопровождается и проявление более широких, свойственных стволовым клеткам потенциалов РПЭ, в определенных условиях *in vitro* оказывающихся способными входить в клеточный цикл и продуцировать клетки как нейрональной, так и мезенхимной линий (Salero et al., 2012). В настоящее время разработаны условия *in vitro*, позволяющие избежать ЭМП и набирать большую численность клеток, имеющих фенотип, близкий к исходному. Исследования их свойств на уровне транскриптома выявляют экспрессию маркеров поверхности и функционирования, близкие таковым нативных клеток РПЭ (Hu, Vok, 2001; Blenkinsop et al., 2013, 2015). При изучении механизма входа клеток РПЭ человека в фазу синтеза ДНК *in vitro* установлено, что, как и в случае инициации пролиферации клеток РПЭ амфибий, ключевую роль играют митоген-активированная протеин киназа (МАРК) и киназа,

регулируемая внеклеточным сигналом (ERK) (Zhang, Liu, 2002). На этом сигнальном пути рецептор ростового фактора активирует *gasGTP*-азу, что приводит к МАРК/ERK фосфорилированию (Hesquet et al., 2002). МАРК/ERK в свою очередь, регулирует экспрессию транскриптов: *c-myc*, *Rax6*, *klf4*, и *MITF*, свидетельствующих о понижении уровня дифференцировки РПЭ (Bharti et al., 2006).

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ РПЭ *IN VIVO* У ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ

Регенерация НС у хвостатых амфибий осуществляется под координированным контролем работы генных сетей, в которых ведущую роль играют ТФ и сигнальные белки, запускающие или ингибирующие ключевые сигнальные каскады (Chiba, Mitashov, 2007). В лаборатории под руководством В.И. Миташова в середине 90-х начались работы по определению молекулярно-генетического профиля клеток РПЭ и пигментного эпителия радужки на разных этапах регенерации сетчатки и хрусталика у взрослого тритона *Pl. waltlii* (Mitashov et al., 1995; Markitantova et al., 2003; Маркитантова и др., 2004; Миташов, 2007). Изучение нативного РПЭ тритона показало, что клетки экспрессируют гены, ответственные за специализацию и меланогенную дифференцировку (Маркитантова и др., 2004; Авдонин и др., 2008; 2010; Маркитантова и др., 2010, 2014, 2015; Grigoryan, Markitantova, 2016). Основное направление наших исследований было связано с поиском и изучением экспрессии регуляторных генов, и генов, кодирующих молекулы, взаимодействия которых могут запускать и контролировать трансдифференцировку РПЭ, последующую пролиферацию нейробластов и дифференцировку клеток, приводящих к восстановлению НС.

В основу подхода к изучению механизмов репрограммирования РПЭ и регенерации сетчатки легла гипотеза сходства регуляторных механизмов, контролирующих процессы развития и регенерации одноименных тканей. Впервые с использованием метода ОТ-ПЦР и гибридизации *in situ*, в регенерирующей сетчатке взрослых *Pl. waltlii* мы идентифицировали гомеобоксодержащие гены “глазного поля” *Rax6*, *Prox1*, *Six3*, принадлежащие регуляторной сети, контролирующей процессы развития тканей глаза (Маркитантова и др., 2004). Со временем реэкспрессия ряда ключевых эволюционно консервативных генов, кодирующих ТФ и сигнальные белки *Rax6*, *Prox1*, *Six3*, *Otx2*, *Fgf2* была выявлена в регенерации хрусталика и сетчатки у других видов амфибий, в том числе хвостатых (Markitantova et al., 2004; Chiba, Mitashov, 2007; Veldman et al., 2007; Авдонин и др.,

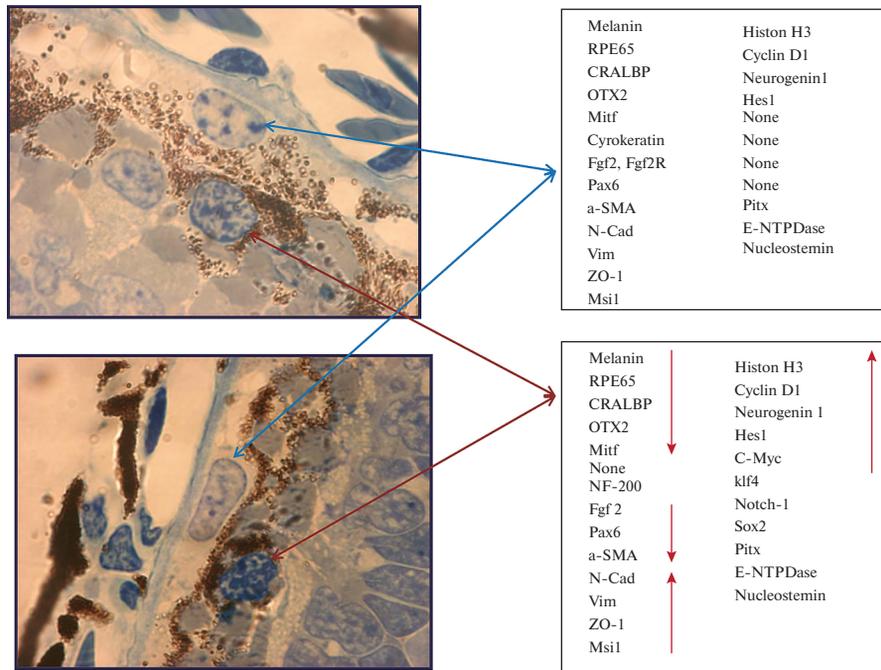
2010; Маркитантова и др., 2010, 2014; Sousounis et al., 2013). Мы исследовали пространственно-временной характер распределения гомеобоксных *Pax6*, *Prox1*, *Six3*, *Pitx1*, *Pitx2* и тканеспецифичных генов *RPE65* и *Otx2* в начале конверсии РПЭ и на последовательных стадиях регенерации сетчатки тритона *Pl. waltlii*, с использованием методов ПЦР, гибридизации *in situ* и иммунохимии (Маркитантова и др., 2004, 2010; Авдонин и др., 2010). Изучение локализации и распределения мРНК показало, что транскрипция мРНК генов *Pax6*, *Prox1* и *Six3* в нативном РПЭ не наблюдается, и что эти гены активируются на ранних этапах регенерации сетчатки (Маркитантова и др., 2004). С внедрением в исследование методов ПЦР, удалось получить более полную картину динамики экспрессии изучаемых генов на последовательных стадиях регенерации, начиная с ранних. Так, с помощью ОТ-ПЦР было показано, что активация генов *Pax6*, *Six3*, *FGF2* происходит на фоне подавления уровня экспрессии мРНК регуляторного гена *Otx2*, контролирующего исходную меланогенную дифференцировку клеток РПЭ, а также гена-маркера дифференцировки РПЭ – *RPE65* (Авдонин и др., 2008). По данным литературы на ранней стадии регенерации сетчатки наблюдается снижение уровня экспрессии не только гена *Otx2*, но и маркеров меланогенеза – *RPE65*, *CRBP*, являющихся мишенями для *Otx2* (Sakami et al., 2005). Наши результаты нашли соответствие с данными об изменении уровня экспрессии ключевых регуляторных генов *Pax6*, *Mitf*, *Otx2* на ранних стадиях развития глаза позвоночных. Показано, что в основе формирования нейробластов развивающейся сетчатки лежат антагонистические взаимодействия между этими генами (Vaumer et al., 2002). Следует отметить, что в депигментирующихся клетках РПЭ зарегистрированы низкие уровни мРНК *Pax6*, *Prox1* и *Six3*, по сравнению с пролиферирующими нейробластами, образующими зачаток сетчатки и характеризующимися активной экспрессией, обнаруженной на ранних стадиях регенерации во всех нейробластах зачатка НС (Маркитантова и др., 2004). В активно пролиферирующих нейробластах будущей сетчатки мы идентифицировали транскрипционную активность гена нуклеостемина (*Ns*), кодирующего белок ядрышка. Солокализация нуклеостемина и *Fgf2* в нейробластах регенерирующей сетчатки позволила выдвинуть предположение об их участии в регуляции пролиферации клеток в составе общего сигнального пути (Маркитантова и др., 2014, 2015; Markitantova et al., 2020). При этом, с учетом профиля экспрессии ряда изученных регуляторных генов и белков, клетки РПЭ тритонов могут быть отнесены к категории клеток с “молодым” фенотипом. Это означает, что в них на низком уровне поддерживается экспрессия ТФ из числа регуляторов раннего развития глаза (early

eye-field genes) (*Pax6*, *Otx2*, *Mitf*, *Pitx1*, *Pitx2*, *Hes1*), участвующих в специфическом молекулярном контексте в контроле дифференцировки РПЭ в эмбриогенезе (*RPE65*, *Pax6*, *Otx2*, *Mitf*, *Pitx1*, *Pitx2*) (рис. 3) (Grigoryan, Markitantova, 2016).

Наши данные продемонстрировали участие перечисленных выше генов в формировании регуляторной сети, контролирующей как транскрипцию клеток РПЭ, так и последовательные стадии регенерации сетчатки. Одним из важных результатов явилось обнаружение сходного с развитием паттерна экспрессии генов интереса на ранней стадии регенерации – в нейробластах регенерирующей НС. Полученные данные позволили также сделать вывод о том, что после ретинэктомии в клетках РПЭ глаза тритона репрессированы гены, определяющие их исходный фенотип, и одновременно экспрессируются новые регуляторные гены, перепрограммирующие РПЭ для приобретения ими свойств стволовых клеток (Маркитантова и др., 2004; Chiba, Mitashov, 2007). Таким образом, предположения, сделанные О.Г. Строевой и В.И. Миташовым о “переключении работы генов” (Строева, Миташов, 1970; Stroeva, Mitashov, 1981) нашли свое экспериментальное подтверждение.

В РПЭ и при регенерации сетчатки глаза тритона вида *Pl. waltlii* мы впервые идентифицировали гомеобокс-содержащие гены *Pitx1*, *Pitx2* и определили локализацию соответствующих белковых продуктов (Авдонин и др., 2008; Маркитантова и др., 2010; Авдонин и др., 2010). Ранее с помощью генного нокаута, было продемонстрировано участие *Pitx2* в регуляции экспрессии генов *Otx2* и *Mitf*, контролирующих меланогенез в ходе дифференцировки клеток РПЭ мыши. В экспериментах по оверэкспрессии гена *Pitx1* было обнаружено существенное снижение экспрессии генов *Otx2*, *Pax6*, а также нейрального маркера *b-тубулина* в глазном бокале и мозге (Evans, Gage, 2005). Согласно этим сведениям, и *Pitx1*, и *Pitx2* находятся на верхней ступени иерархии генов, контролирующих процессы меланогенеза и нейрогенеза. У хвостатых амфибий после травмы тканей отмечена также активация генов иммунного ответа и протоонкогенов, из числа ТФ – *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* (Maki et al., 2009).

Важным стало определение времени, когда происходит репрограммирование, когда реализуется решение клеток РПЭ тритона пойти по иному пути. С помощью количественной ПЦР на изолированных клетках удалось выяснить, что первые дочерние клетки РПЭ на 10-й день после ретинэктомии инициируют работу генов плюрипотентности *c-Myc*, *Klf4* и *Sox2*, а также *Mitf* и *Pax6* (Islam et al., 2014). По времени это совпадает со входом клеток в пролиферативную фазу и экспрессией маркера нейральных стволовых клеток



**Рис. 3.** Микрофото (слева) клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) вскоре после разобщения его с фоторецепторами в результате отслойки сетчатки у тритона. Голубые стрелки – клетки, находящиеся еще в слое РПЭ; красные стрелки – клетки РПЭ, в начале процесса трансдифференцировки, покинувшие слой РПЭ. Видны отличия в состоянии хроматина. Справа – выявленные гены и белки (суммированные сведения), красные стрелки указывают отличия в экспрессии по сравнению с клетками, сохраняющимися в слое РПЭ.

Musashi-1 (Kaneko, Chiba, 2009), а также пан-нейрального маркера NF (Григорян, Антон, 1993). Важно, что в это время экспрессия гена, кодирующего специфический белок РПЭ – RPE65, была сходной по уровню как для интактных клеток РПЭ, так и для первых клеток зачатка НС. Это свидетельствовало о сохранении одного из основных признаков исходной дифференцировки в момент появления клеток с признаками мультипотентности. Позже в клетках зачатка экспрессия RPE65 подавлялась, в то время как гены мультипотентности продолжали экспрессироваться до 14–15-го дней регенерации, до формирования многорядного зачатка НС, после чего уже в полную силу включались гены пронеуральной дифференцировки и затем гены специфических клеточных типов и глии.

Совокупность полученных нами и коллегами сведений, свидетельствует о частичном сохранении РПЭ интактных, половозрелых хвостатых амфибий клеточного, молекулярно-генетического и эпигенетического профилей, характерных для ювенильных состояний, наряду с экспрессией всех признаков функциональной специализации (Grigoryan, Markitanova, 2016; Grigoryan, 2020). Эти данные согласуются с результатами работы на РПЭ куриного эмбриона (ст. Е4), также способного к смене клеточного типа *in vivo* и экспрессирующего ряд факторов – маркеров клеточ-

ной плюрипотентности (klf4, c-мус, lin-28) (Luz-Madrigal et al., 2014). Некоторые регуляторные белки, такие как Wnt, гликопротеины, в кооперации с ТФ плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog, участвуют в регуляции пролиферации клеток, в частности, поддержании пула стволовых клеток при регенерации тканей (Desai et al., 2010; Katsman et al., 2012; Khan et al., 2015). Накопленные экспериментальные результаты дают основания предполагать, что на самых ранних стадиях регенерации НС в тканях заднего сектора глаза в большей мере востребованы факторы, участвующие в защите клеток РПЭ от гибели и поддержании их функций. Для амфибий и высших позвоночных в качестве еще одного из таких факторов обсуждается эпидермальный фактор роста (Egf) (Defoe, Grindstaff, 2004).

Итак, существенным достижением в исследованиях молекулярных механизмов регенерации сетчатки у хвостатых амфибий стало обнаружение сходства основной сети регуляторных генов, контролирующей процессы развития и регенерации сетчатки, сходство молекулярных механизмов процессов клеточной дифференцировки после образования слоя нейробластов в развитии и при регенерации. Однако, существуют и различия. Они связаны с отличием клеточных источников формирования НС: в ходе эмбрионального развития источником служат клетки внутреннего

слоя глазного бокала, а в процессе регенерации сетчатки клетки РПЭ.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ РПЭ *IN VIVO* У МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА

Процесс ЭМП играет важную роль в развитии органов, клеточном репрограммировании, а также процессах метастазирования (Kalluri, Weinberg, 2009). Целостность РПЭ поддерживается координированным взаимодействием генов, контролирующих процессы, обеспечивающие стабильное дифференцированное состояние этой ткани (Strauss, 2005). Утрата фенотипических черт РПЭ при патологических состояниях лежит в основе возникновения и прогрессирования пролиферативных нарушений в глазу, таких как ПВР. ЭМП клеток РПЭ как часть aberrантной реакции при ранозаживлении при данной патологии способствует формированию ЭМ (Snead et al., 2008; Tamiya, Kaplan, 2016). Особенности ЭМП в РПЭ млекопитающих связаны с утратой полярности, специализированных плотных межклеточных контактов (tight junctions), реорганизацией цитоскелета, и приобретением свойств мезенхимальных клеток (Philp, Nachmias, 1987; Huang et al., 2012). Основным событием реорганизации цитоскелета в РПЭ при ЭМП является смена паттернов экспрессии кадгеринов (Thiery, Sleeman, 2006; Imachi, Menke, 2007): при каноническом ЭМП в РПЭ происходит подавление экспрессии N-кадгерина (CDH2) и переключение на экспрессию кадгеринов, специфичных для РПЭ, таких как E (CDH1) и R (CDH3) (Maeda et al., 2005; Nieto, 2011).

Молекулярные основы ЭМП в РПЭ, включая изменения в экспрессии и регуляции генов, остаются плохо изученными (Vadigepalli et al., 2003; Nazarieh et al., 2016). Они включают изменения в экспрессии функционально значимых генов под контролем специфических ТФ в генетической сети, в контексте паттернов скоординированной регуляции в РПЭ в норме и в процессе ЭМП. Один из аспектов этой регуляции предполагает упомянутое выше переключение экспрессии подтипов кадгериновых белков. Процесс ЭМП в РПЭ сопровождается подавлением экспрессии ТФ, индуцирующих ЭМП (ЭМП-ТФ), таких как Snail, Slug, ZEB1/2, TWIST, GSC (Choudhary et al., 2015) и других, вызывающих классический ЭМП при фиброзной и онкотрансформации (Hua et al., 1998; Kang, Massague, 2004). Взаимодействия с этими ТФ играют центральную роль в механизмах репрессии E-кадгерина в мезенхимальных клетках, поскольку она является одним из важных условий для возврата в эпителиальное состояние.

С применением методов компьютерного моделирования, биоинформационного и биохимического анализа, обнаружены биологически значимые ТФ, способные регулировать фенотип клеток РПЭ (Pratt et al., 2008). В промоторах ряда генов идентифицированы специфические элементы, отвечающие за транскрипцию (TRE) при связывании с ТФ – кандидатами на роль главных “узлов” в транскрипционной сети, регулирующей ЭМП в РПЭ. Среди предсказанных мишеней действия ТФ, рассматриваемых в качестве потенциальных терапевтических мишеней в профилактике и лечении пролиферативных заболеваний сетчатки и РПЭ человека находятся: Oct-1, ядерный фактор гепатоцитов 1 (HNF-1), ядерный фактор транскрипции GATA-1, SMAD3, фактор транскрипции E (TFE), фактор регуляции интерферона-1 (IRF), HNF3alpha, E2F, CDP, SP3, гомеобоксодержащий ген NKX3A, связывающий регуляторный элемент стерола белок-1 (SREBP-1), фактор-усилитель лимфоцитов-1 (LEF-1), а также N- и R-кадгеринов. Дифференциальная и скоординированная экспрессия функциональных кластеров регуляторных генов во время ЭМП РПЭ подтверждена ПЦР с обратной транскрипцией (Pratt et al., 2008).

В качестве моделей для выявления механизмов приобретения эпителиального фенотипа и ЭМП, широко используются клетки РПЭ, полученные из человеческих эмбриональных стволовых клеток (hESC), РПЭ плода человека и РПЭ клеточной линии ARPE19 (Vaajasaari et al., 2011; Buchholz et al., 2013; Lynn et al., 2017; Zhou et al., 2020). Важную роль в определении эпителиальной судьбы РПЭ играет ТФ – протоонкоген FOXM1 (Benayoun et al., 2011). На отмеченных модельных системах показано, что РПЭ претерпевает ЭМП, зависимым от ТФ FOXM1 способом. Сверхэкспрессия FOXM1 приводит к усилению свойств эпителиального фенотипа, о чем свидетельствует повышенная экспрессия маркера РПЭ – премеланосомного белка PMEL17. Предполагается, что это достигается за счет непосредственной регуляции пролиферации РПЭ. Установлено также, что FOXM1 напрямую регулирует пролиферацию клеток РПЭ посредством контроля кластеров генов, связанных с пролиферацией (клеточным циклом, репликацией ДНК, биогенезом рибосом). Связь с пролиферацией подтверждается ассоциацией FOXM1 с промоторами генов, регулирующий клеточный цикл (Chen et al., 2013). Нокдаун FOXM1 с помощью siRNA приводит к снижению экспрессии позитивных регуляторов клеточного цикла (CDC5L, CDK12 и FZR1) и увеличению экспрессии CDKN1A, известного ингибитора клеточного цикла (Wang et al., 2005; Qu et al., 2013). Механизм ЭМП включает также участие ТФ FOXM1 в модуляции экспрессии сигнальных белков BMP7 и Wnt5B, способных пере-

давать внеклеточные сигналы и влиять на судьбу эпителия антагонистическим образом. Действуя реципрокно, они обеспечивают поддержание эпителиального фенотипа. Экзогенный рекомбинантный Wnt5B существенно снижает экспрессию эпителиальных маркеров, меняя фенотип эпителиальных клеток в сторону мезенхимального (Choudhary et al., 2015). Взаимные антагонистические взаимодействия BMP/Wnt необходимы для самообновления РПЭ, что продемонстрировано в различных клеточных системах РПЭ (Kandyba et al., 2013; Stewart et al., 2014). Действие FOXM1 на BMP7 и Wnt5B может быть опосредованным, поскольку связывание с промоторами их генов не обнаружено. Регуляция со стороны FOXM1 может происходить посредством воздействия на другие, вышестоящие факторы, или на пост-транскрипционном уровне, как это описано для регуляции комплекса SMAD3/4 (Xue et al., 2014). В совокупности, имеющиеся экспериментальные данные указывают на то, что FOXM1 регулирует пролиферацию клеток РПЭ, действуя как активатор или репрессор генно-зависимым образом.

В наших работах, а также коллегами из Японии, были выявлены некоторые особенности экспрессии ряда генов, кодирующих ТФ, в том числе *Raxb*, *Otx2*, *Fgf2* при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий, в отличие от моделей повреждения сетчатки у млекопитающих. Дополнительным подтверждением выдвинутой нами гипотезы о клеточных и молекулярных особенностях РПЭ *Urodela*, позволяющих этим клеткам естественное репрограммирование (natural reprogramming) в нейроны сетчатки, являются результаты, полученные японскими исследователями в 2016 г. (Casco-Robles et al., 2016). Эта работа, проведенная с помощью нокаута гена *Raxb* с использованием технологии Cre-lox у личинок тритонов *Synops pyrrohogaster*, явилась ключевым исследованием в понимании различий в выборе путей конверсии РПЭ – приобтерений нейральной или мезенхимной дифференцировок (Casco-Robles et al., 2016). Так, у хвостатых амфибий ключевой фактор транскрипции *Raxb* отвечает за репрограммирование клеток РПЭ в клетки НС при ее регенерации *in vivo*. Оказалось, что отсутствие экспрессии этого мастера гена блокирует регенерацию НС у взрослых тритонов и индуцирует в клетках РПЭ тритона выход в мезенхимную дифференцировку, как известно, обуславливающую ПВР у человека. Вместо участия в регенерации НС клетки, покидая слой РПЭ, формировали многоклеточные агрегаты, не способные к организации упорядоченного слоя. В агрегатах наблюдалась экспрессия маркерных белков миофибриллярных – альфа-гладкомышечного актина (*alpha-SMA*), виментина (*Vim*) и N-кадгерина (*N-Cad*). Предполагается, что в ходе эволюции механизм, используемый *Urodela* для регенерации сетчатки,

эволюционировал таким образом, что его модификация в конечном итоге у амфиот легла в основу РПЭ-зависимых патологий (Casco-Robles et al., 2016). Важно отметить тот факт, что данный выбор клетками РПЭ осуществляется рано, сразу после выхода клеток из слоя, в норме сдерживающего трансформации фенотипа РПЭ. Кроме консервативных функций, установленных для ТФ, и, в частности для *Raxb*, существуют различия в стратегиях поведения и трансдифференцировки клеток РПЭ у эволюционно отдаленных видов позвоночных, объясняемые особенностями в регуляции клеточными процессами, как на локальном, эпигенетическом, так и организменном уровнях (Маркитантова, Самирский, 2020). Следовательно, для рассматриваемой нами системы трансдифференцировки клеток РПЭ в нейральную ткань сетчатки у взрослых амфибий и при ЭМП клеток РПЭ у млекопитающих, напрашивается заключение, что в обоих случаях имеет место близкая молекулярная основа, но содержащая модификации работы ключевых генов. В свою очередь, эти модификации обусловлены действием регуляторных механизмов (как вне- так и внутриклеточных), влияющих на эпигеном клеток РПЭ.

#### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СО СТОРОНЫ МИКРООКРУЖЕНИЯ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РПЭ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У АМФИБИЙ

Понимание регуляции со стороны клеточного микроокружения являются ключом к направленному изменению поведения клеток РПЭ с целью восстановления сетчатки и/или ингибированию патологических состояний РПЭ. В процессе изучения двух стратегий конверсии РПЭ у амфибий и млекопитающих выше мы отметили сходство в клеточном поведении, инициации, прогрессе трансдифференцировки, а также последовательности ее основных этапов. В то же время накопленная информация свидетельствует о том, что в регуляторных факторах микроокружения и в малоизученном пока паттерне их экспрессии присутствуют отличия. Известно, что многие регуляторные факторы производятся и секретируются как НС, так и собственно клетками РПЭ, в ответ на разобщение с сетчаткой (Grigoryan et al., 2012; Pastor et al., 2016).

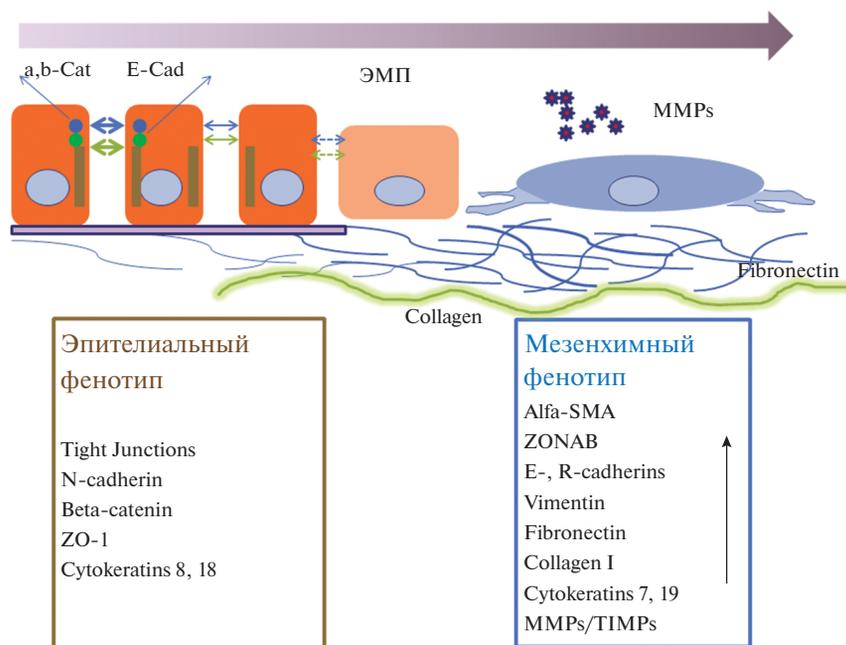
Среди изучаемых сигнальных белков, которые вовлечены в контроль регенерации сетчатки, внимание приковано к участникам молекулярных каскадов *Fgf*, *Bmp*, *Wnt*, *Shh* (Hayashi et al., 2004; Mercer et al., 2012; Григорян и др., 2013; Shera et al., 2014; Grigoryan, Markitantova, 2016). В наибольшей степени нами изучена роль сигналь-

ного пути FGF2, являющегося ключевым для регенерации сетчатки у тритона (Маркитантова и др., 2014). В исследованиях работы компонентов сигнального каскада FGF2 обнаружено, что в ранний период после удаления сетчатки в регенерате происходит down-регуляция гена *fgf2*, что свидетельствует о подавлении сигналов Fgf2 до инициации пролиферации клеток РПЭ, сразу после ретинэктомии (Маркитантова и др., 2014). Согласно сведениям, полученным зарубежными коллегами для других видов Urodela, и нашим данным по *Pl. waltlii*, Fgf2 не является первичным, индуцирующим процесс конверсии клеток РПЭ, а выполняет эволюционно консервативную функцию митогена. Усиление экспрессии и митогенный эффект Fgf2 связан с более поздней по времени стимуляцией пролиферативной активности нейробластов регенерата НС и периодом резкого ее возрастания (Susaki, Chiba, 2007; Mercer et al., 2012; Маркитантова и др., 2014). Основным источником сигналов FGF может служить сосудистая оболочка глаза (Azuma et al., 2005; Araki et al., 2007). Наблюдаемая нами активация FGF2 в раннем регенерате НС, представленном слоем нейробластов, и в клетках Мюллера дифференцированной НС (Маркитантова и др., 2014), коррелирует с ранним формированием в ходе регенерации клеток макроглии, которая, возможно, является еще одним источником этого фактора (Sakami et al., 2005). Иммуногистохимически определена локализация белка FGF2 и его рецепторов Fgfr2 в РПЭ и хороиде, а также во внутренней НС, зрительном нерве и ростовой зоне (*pars ciliaris* и *ora serrata*) нативного глаза тритона. С помощью ПЦР в реальном времени обнаружено, что гены и белки FGF2 обладают дифференциальной экспрессией не только в ходе регенерации сетчатки *in vivo*, но и *in vitro* (Маркитантова и др., 2014; Markitantova et al., 2020). Для белков теплового шока (HSPs), обнаруженных нами в сетчатке тритонов и различно экспрессируемых в норме и при регенерации, помимо их шаперонной активности, также предполагается регуляторная роль в конверсии РПЭ. В трансдифференцировке РПЭ у тритона показано участие сигнального пути Notch (Kaneko et al., 2001; Nakamura, Chiba, 2007). Прослежена динамика экспрессии Notch-1, возрастающей по мере развития регенерата НС и снижающаяся при выходе клеток в дифференцировку. Введение блокатора DAPT приводит к преждевременному созреванию нейронов в бластеме НС. Выяснено также, что клетки РПЭ тритона в ходе регенерации НС дифференциально экспрессируют сигнальные молекулы Hes-1, neurogenin1 и Delta. На роль участника регуляторной сети микроокружения клеток РПЭ претендует и сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -catenin, регулирующий регенерацию сетчатки у рыб и куриного эмбриона (Meyers et al., 2012; Gallina et al., 2016).

Факторы микроокружения работают локально и короткодистантно, и в экспрессии обнаруживают сходство с активностью в период гистогенеза сетчатки глаза. Однако эти события в иерархии системы надклеточного сигнализирования находятся ниже системных, общеорганизменных факторов. К последним относятся: гормоны, факторы иммунной системы и крови. Хвостатые амфибии, животные с наиболее высоким регенераторным потенциалом, являясь пedomорфными, демонстрируют ускоренное половое созревание, тормозящее соматическое развитие (Grigoryan, 2021). В основе феномена лежит активность тиреоидного гормона (ТГ) – главного регулятора метаморфоза у амфибий. В свою очередь, действие ТГ опосредовано его рецепторами, являющимися ядерными ТФ, и экспрессией генов *met1–3*. Показана регуляция функции ТГ со стороны “гена гетерохронии” *lin28*, члена семейства генов *Lin28*, кодирующих ТФ, известные в качестве индукторов плюрипотентности соматических клеток высших позвоночных (Faunes et al., 2017). Можно предположить роль этого и подобных ему генов в поддержании клеток на уровне дифференцировки, перmissive для конверсии в нейрональном направлении через регуляцию ТГ, ТСГ (тиреоид-стимулирующего гормона) и других гормонов. В областях регенерации хрусталика, конечности и сетчатки у тритона была выявлена экспрессия факторов иммунной системы комплемента – С3 и С5 (Kimura et al., 2003). Комплемент С3а способен индуцировать регенерацию сетчатки из РПЭ у эмбриона цыпленка через активацию регулятора транскрипции STAT3, в свою очередь активирующего факторы ответа на повреждение и воспаление IL-6, IL-8 и TNF. Это, в итоге, приводит к регуляции генов сигнального пути Wnt2b, а также генов *Six3* и *Sox2*, кодирующих ТФ, характерные для прогениторных клеток (Haynes et al., 2013). Все эти данные служат накоплению информации, необходимой для последовательного выстраивания сети, регулирующей трансдифференцировку РПЭ у Urodela.

#### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РПЭ СО СТОРОНЫ МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ПВР У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В качестве основного регулятора стабилизации эпителиального фенотипа РПЭ, кадгерин-зависимой межклеточной адгезии и пигментации клеток у млекопитающих рассматривается сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -catenin (Burke, 2008). В ходе ЭМП клетки РПЭ теряют черты специализации, межклеточные контакты и адгезию, приобретают характеристики мигрирующих мезенхимных клеток (Kigasawa et al., 1998; Tosi et al., 2014; Tamiya,



**Рис. 4.** Изменения композиции белков контактов клеток РПЭ и ВКМ при пролиферативной ретинопатии у млекопитающих. ЭМТ – эпителиально-мезенхимный переход; MMPs/TIMPs – матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы.

Karlan, 2016). Вместо синтеза характерных для РПЭ внутриклеточных белков, таких как цитокератины, клетки экспрессируют  $\alpha$ -SMA и белки стресс фибрилл (Feist et al., 2014). Эти события происходят под контролем ростовых факторов и резидентных клеток воспаления, находящихся в циркулирующей крови и стекловидном теле глаза (Wiedemann, 1992; Pastor et al., 2002) (рис. 4). В контроле со стороны иммунной системы участвуют цитокины – интерлейкины – (IL-) 1, IL-6, IL-8, IL-10, а также интерферон-гамма (INF- $\gamma$ ) (Morescalchi et al., 2013). Существующие представления о патогенезе ПВР включают изменение локальных концентраций не только цитокинов, но и ряда ростовых факторов, управляющих процессами трансдифференцировки, миграции, пролиферации и формирования ВКМ (Parmegiani et al., 2010). В первую очередь к ним относится трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ), а также фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста, выделенный из тромбоцитов (PDGF), сигнальные пути Notch, Wnt/ $\beta$ -catenin, и сигнальный путь Hippo (Bochaton-Piallat et al., 2000; Spraul et al., 2004; Stern, Temple, 2015; Chen et al., 2015). TGF $\beta$  обнаруживается в глазах пациентов с ПВР, на уровне экспрессии, положительно коррелирующим с развитием патологии (Connor et al., 1989; Shu et al., 2017). Роль TGF $\beta$  в трансдифференцировке в мезенхимном направлении многократно показана как для человека (Stocks et al., 2001; Li et al., 2011; Xiao et al., 2014; Dvashi et al., 2015), так и на мышинной модели ПВР (Saika et al., 2004; Saika et al.,

2007). У человека TGF $\beta$ 2 активирует p38 MAPK сигнальный путь, а при его ингибировании происходит подавление синтеза коллагена I типа (Kimoto et al., 2004). Обнаружено, что наряду с TGF $\beta$  активируется и TNF $\alpha$ , то есть имеет место влияющее на прогресс ЭМП комбинаторное действие этих факторов. У человека рецепторы этих сигнальных молекул обнаружены в нативном РПЭ (Strunnikova et al., 2010; Boles et al., 2020). Роль TGF $\beta$ , привлекающая наибольшее внимание исследователей, выявлена в активации многих сигнальных каскадов при ЭМП клеток РПЭ, что, в свою очередь, дает ключи к лечению ПВР (Yang et al., 2015). Помимо TGF $\beta$  в исследованиях моделей ЭМП клеток РПЭ *in vivo* и *in vitro* продемонстрирована важная роль сигнального пути Smad. У мышей, дефицитных по Smad показано подавление процесса конверсии РПЭ после индукции ЭМП с помощью TGF $\beta$ , а также в случае экспериментальной отслойки НС (Saika et al., 2004). Как отмечено выше, клетки РПЭ быстро отвечают на отслойку НС активацией ERK сигнального пути и повышением экспрессии ТФ AP-1. Основным фактором роста FGF2 также включен в ранний ответ РПЭ на отслойку НС (Geller et al., 2001), как и при конверсии РПЭ у тритона.

Как упомянуто выше, есть экспериментальные доказательства того, что клетки РПЭ взрослого человека *in vitro* могут демонстрировать свойства нейрональных клеток. Это предполагает поиск факторов, препятствующих трансдифференцировке РПЭ в нейральные клетки сетчатки

*in situ* и, напротив, индуцирующих дифференцировку клеток РПЭ в нейрональном направлении, за счет подавления ЭМП, для восстановления НС после травмы или патологии. Действие FGF2 *in vitro* на клетки РПЭ человека проявляется в консервативной функции в качестве митогена для поддержания пролиферации клеток, а на генном уровне — для модуляции экспрессии генов, принимающих участие в нейральной дифференцировке (Шафеи и др., 2017). Однако, в данной системе, появление клеток нейрального фенотипа регистрируется на фоне сохранения свойств клеток мезенхимной линии дифференцировки, о чем свидетельствует экспрессия широкого ряда маркеров не нейрональной природы. Методами иммуноцитохимии, ПЦР, ПЦР-РВ и МТТ-теста получены данные о роли сигнальных путей TG-Fb/BMPs, WNT, Notch и FGF в регуляции пластичности клеток ARPE-19 взрослого человека. В клетках РПЭ глаза взрослого человека *in vitro* зарегистрирована транскрипция мРНК Notch и BMPs, лигандов сигнальных путей, способных ингибировать нейральную дифференцировку клеток. Сигналы Wnt способны модулировать экспрессию белков Notch и BMPs. Wnt1 усиливает пронейральную дифференцировку, в то время как Wnt7a влияет на дедифференцирующиеся *in vitro* клетки РПЭ контекст зависимо, усиливая в одних клетках процессы нейральной дифференцировки, в других — редифференцировку в пигментированные эпителиальные клетки (Kuznetsova et al., 2014; Ржанова и др., 2020).

Таким образом, регуляторные события, происходящие при конверсии клеток РПЭ млекопитающих в мезенхимном направлении, как и в случае конверсии РПЭ в нейральном направлении у амфибий, разнообразны, имеют сходства и отличия, но до конца не определены. Это делает сопоставления затруднительными, однако, очевидно, что регуляционные сети при выборе разных стратегий трансдифференцировки имеют для амфибий и млекопитающих свои специфические динамические паттерны.

#### ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА В ХОДЕ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РПЭ У АМФИБИЙ И ПАТОЛОГИИ СЕТЧАТКИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Как мы видим, ключевым и в настоящее время хорошо документированным событием трансдифференцировки РПЭ у амфибий является репрограммирование, переключение генной программы, обеспечивающей эпителиальную, меланогенную дифференцировку, на программу, приводящую к нейральной и глиальной дифференцировкам. Каким образом осуществляется регуляция репрограммирования со стороны эпигенома — вопрос

детального изучения в будущем. В настоящее время есть понимание того, что существенную роль в уровне экспрессии тех или иных генов играет динамическая композиция хроматина (Venters, Pugh, 2009; Chen, Dent, 2014). Характер перестроек хроматина при репрограммировании РПЭ тритона и их роль в активации транскрипционной программы, обеспечивающей ретиногенную дифференцировку изучен предварительно. Мы предприняли попытку охарактеризовать состояние хроматина в начале конверсии РПЭ тритона при разобщении РПЭ и НС, вызванном облучением сетчатки ярким светом или механической отслойкой (Маркитантова и др., 2015; Николаев и др., 2017). Данные свидетельствуют о том, что на 7–10-й дни после разобщения РПЭ и НС в вымещающихся из слоя клетках РПЭ, происходит реорганизация хроматина, очевидная на окрашенных полутонких срезах, при сравнении с клетками, сохраняющимися в слое РПЭ (рис. 3). В ядрах клеток в слое РПЭ наблюдалось диффузное распределение небольших локусов компактизации, прикрепленных к ядерной мембране (пристеночный гетерохроматин). В вымещающихся клетках РПЭ имело место увеличение объемов компактизованного хроматина (прицентромержный гетерохроматин), менялось соотношение конденсированного и диффузного хроматина в пользу первого, происходило центробежное его смещение, снижалось число компактизованных областей хроматина при увеличении их объемов, имел место фолдинг ядерной мембраны (Маркитантова и др., 2015). Всем этим изменениям была дана количественная оценка при использовании программ компьютера (Николаев, 2018). Описанные изменения, как известно, не предусматривают активной транскрипции, но напротив, свидетельствуют о репрессии этого процесса (Popova, Barnstable, 2019). Мы предполагаем, что обнаруженные нами изменения хроматина и ядерной мембраны в репрограммируемых клетках РПЭ тритонов связаны с ответом на клеточный стресс, уходом от точной гибели и подготовкой к пролиферации. Помимо событий, связанных с реорганизацией хроматина, известно также, что в РПЭ взрослых тритонов присутствует экспрессия кодируемого геном *Ns* нуклеостемина, регулятора транскрипционной активности, характерного для стволовых и малодифференцированных клеток, маркера пролиферации (Maki et al., 2009; Маркитантова и др., 2014, 2015). Работа гена *Ns* в ткани РПЭ также является эпигенетическим пререквизитом высокой пластичности их дифференцировки при регенерации *in vivo* (Маркитантова и др., 2014).

В исследовании эпигенетического ландшафта клеток нативного РПЭ взрослых мышей Дворянчикова и соавторы (Dvorianchikova et al., 2019) опирались на факты о свойствах ретинальных прогениторов, общих для РПЭ и НС, развиваю-

щихся из общего зачатка (Лопашов, Строева, 1961; Chow, Lang, 2001; Graw, 2010). Возникло предположение, что клетки РПЭ взрослых мышей могут сохранять сходства эпигенома, присущие ретинальным предшественникам. Авторам (Dvorianchikova et al., 2019) удалось показать, что состояние метиломов в клетках РПЭ эмбрионов и взрослых мышей, действительно, сходно: большинство промоторов генов находится в открытом (активном) хроматине, характерном для эпигенетически мобильных стволовых и прогениторных клеток. В то же время детальный анализ метилирования генов, ответственных за спецификацию ретинальных фенотипов, указал на локализацию промоторов генов, контролирующих дифференцировку не фоторецепторных нейронов, в репрессированных участках хроматина, находящихся в неметилированных (слабо метилированных) его областях. По мнению авторов (Dvorianchikova et al., 2019), активация этих генов возможна в присутствии “пионерских” ТФ, способных инициировать транскрипционные события в закрытом хроматине. В то же время большинство генов, ответственных за фоторецепторную дифференцировку, оказались высоко метилированы. Таким образом, деметилирование регуляторных элементов фоторецепторных генов – второй механизм, необходимый для реализации конверсии клеток РПЭ в ретинальном направлении. Предполагается, что оба механизма (работа пионерских ТФ и деметилирование регуляторных элементов фоторецепторных генов) присущи РПЭ амфибий и работают при регенерации сетчатки после повреждения (Dvorianchikova et al., 2019). Не исключено также, что у тритонов, исходно обладающих ювенильными свойствами (Григорян, 2016; Grigoryan, 2021) понижение уровня дифференцировки в ходе репрограммирования, не требует масштабных модификаций работы генов, при одновременном наличии перmissive для быстрого переключения программ эпигеноме. Подтверждением этого предположения может быть упомянутая выше, обнаруженная нами в нативных клетках РПЭ тритонов совместная работа генов, кодирующих признаки как исходной, так и новой дифференцировок (Grigoryan, Markitantova, 2016). Роль ТФ, обладающих свойствами “пионерских”, то есть способных индуцировать прямое репрограммирование клеток РПЭ человека, обсуждается в обзоре Ржановой и соавторов (2020). Авторы предполагают, что терминально дифференцированный РПЭ млекопитающих богат эпигенетическими регуляторными механизмами, жестко фиксирующими специфические паттерны экспрессии генов (Ржанова и др., 2020).

У млекопитающих и человека нарушения состояния хроматина и изменения эпигенетической регуляции работы генов при многих заболеваниях приводят к использованию патологиче-

ских программ экспрессии генов, в том числе кодирующих ферменты, отвечающие за модификации ДНК и гистоновых белков, в свою очередь определяющих архитектуру хроматина (Mirabella et al., 2016; Popova, Barnstable, 2019; Basinski et al., 2021). Врожденные нарушения в сетчатке млекопитающих, такие как микрофтальмия, анофтальмия и колобома ассоциируются с изменениями в работе регуляторных генов, кодирующих ТФ (Markitantova, Simirskii, 2020), а также генов, кодирующих эпигенетические белки, в свою очередь, реорганизуящие хроматин (Oliver et al., 2016; Basinski et al., 2021). Накоплена информация об эпигенетических изменениях и их связи с ТФ и о последствиях этой связи в ходе ЭМП. Однако, внимание в основном уделено случаям ЭМП при развитии опухолей (Wang, Shang, 2013; Sun, Fang, 2016). Если опираться на эту информацию в совокупности с полученной на моделях РПЭ-зависимой патологии НС, а также в экспериментах *in vitro*, становится ясно, что программа конверсии РПЭ при ЭМП в ходе развития ПВР регулируется как ТФ, так и эпигенетическими изменениями. Последними являются – метилирование ДНК, модификации гистонов, а также микроРНК (miRNAs), способные ингибировать трансляцию ряда генов. В патогенезе ПВР выявлена важная роль miR-29b, осуществляющей негативную регуляцию Akt2 сигнального пути (Li et al., 2016). Определена роль ингибитора деацетилазы гистонов (HDACi) – трихостатина, ингибирующего канонический сигнальный путь Smad и сигнальные пути Jagged/Notch, PI3K/Akt, и MAPK/ERK1/2. Ингибитор устранял TGFβ-индуцированные морфологические изменения клеток РПЭ человека в мезенхимном направлении и предотвращал up-регуляцию α-SMA, FN, коллагена I и IV типов (Xiao et al., 2014). Попытки воздействия с помощью miRNA на ключевые, определяющие ЭМП сигнальные пути, были сделаны на культуре клеток линии ARPE-19 человека (Fuchs et al., 2020). TGFβ, активирующий сигнальные белки SMAD2 и SMAD3, воздействует на активность ряда генов, среди которых VEGFA. Ингибируя этот процесс, Fuchs et al. (2020) использовали miR-302d и miR-93, способные регулировать сигнальный путь TGFβ на разных уровнях. miR-302d и miR-93 направляли TGFβ-зависимую конверсию клеток ARPE-19 в мезенхимном направлении вспять, возвращая клеткам ARPE-19 признаки эпителиальной дифференцировки. Предполагается, что данный подход в дальнейшем может быть использован при лечении ПВР (Fuchs et al., 2020).

Продолжается поиск молекулярных регуляторов детерминации эпителиальной судьбы РПЭ и ее переключения на путь мезенхимной или иной дифференцировки, с использованием современных методов анализа транскриптома, генома, протеома, что лежит в основе разработки пер-

спективных подходов клеточной терапии для поддержания стабильности и жизнеспособности РПЭ (Alge et al., 2003; Pratt et al., 2008; Du et al., 2016; Saini et al., 2017; Boles et al., 2020). Возникновение ЭМ, полученных от пациентов с ПВР, связано с активацией сигнальных путей TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  (Asato et al., 2013; Roybal et al., 2018), которые синергетически могут активировать программу ЭМП в клетках РПЭ взрослого человека (RPESC). Повышение уровня TGF- $\beta$  (Kita et al., 2008) и TNF- $\alpha$  (Korthagen et al., 2015) было отмечено в стекловидном теле пациентов с ПВР и коррелирует с тяжестью этого заболевания. Для выявления механизмов этих процессов предпринимаются попытки создания карты связанных эпигенетических и транскрипционных изменений в РПЭ в норме и в случае ЭМП (Choudhary et al., 2015). Показано, что наиболее заметные эпигенетические изменения, сопровождающие ЭМП, связаны с усилением меток активного хроматина на многих элементах энхансеров предполагаемых мишеней связывания с ТФ — ключевыми кандидатами, которые могут быть вовлечены в регуляцию этого процесса. При сопоставлении данных анализа эпигенома и транскриптома РПЭ в норме и после обработки факторами TGF- $\beta$ 1 и TNF- $\alpha$ , был идентифицирован ландшафт регуляции генов, сопровождающий ЭМП. Ранее установлено, что в клетках РПЭ, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека и индуцированных в направлении ЭМП, происходит ингибирование пути TGF- $\beta$ , и развитие воспалительных процессов, после обработки никотинамидом (NAM, производное витамина B3) (Saini et al., 2017). Воздействие NAM на RPESC-RPE взрослого человека, усиливающее эпителиальный фенотип, предотвращает ЭМП трансформацию и рассматривается в качестве способа терапии пациентов с ЭМ (Schiff et al., 2019). Среди эффективных стратегий, направленных на подавление сигнальных путей, вовлеченных в патологию РПЭ, рассматривается модуляция передачи сигналов RhoA/Rho-kinase, Smad или MAPK (Saika et al., 2009; Yan et al., 2009). Другие подходы предполагают блокирование экспрессии ALK5, что эффективно подавляет развитие фиброза (Ishida et al., 2006; Pannu et al., 2007), ингибирование ключевых факторов ангиогенеза (Fernandez-Robredo et al., 2014) и деацетилазы гистонов (Xiao et al., 2014).

Подводя итоги, можно констатировать, что РПЭ низших и высших позвоночных животных обладает высокой степенью пластичности, проявляющейся в способности к смене клеточного типа — трансдифференцировке. При наблюдении за этим процессом *in vivo*, мы обнаруживаем две различные стратегии поведения: конверсию в нейрональном и глиальном направлении при регенерации сетчатки у амфибий и в мезенхимном при патологии сетчатки у млекопитающих и че-

ловека. В направленных условиях *in vitro* РПЭ млекопитающих раздвигает рамки этих возможностей, демонстрируя конверсию в фенотипы, несущие пронеуральные признаки. В основе механизмов конверсии *in vivo* в обеих стратегиях можно обнаружить сходство, например, в инициации процесса и сопряженных с ней изменений цитоскелета и ВКМ, в пролиферативной активности, способности к миграции клеток РПЭ. Однако имеет место ряд существенных отличий, прежде всего, в молекулярно-генетических регуляторных механизмах: работе ТФ, ростовых факторов и цитокинов, компонентов сигнальных путей, а также в отличающемся эпигенетическом ландшафте. Отметим, что все три ключевые системы регуляции находятся в динамическом взаимодействии. В этой связи, опора на одну из перечисленных систем вряд ли может помочь в понимании того, каким образом можно экспериментально менять стратегии конверсии РПЭ. В этой связи дальнейшие исследования биологии клеток РПЭ, феномена трансдифференцировки РПЭ, и связи ключевых регулирующих ее разноуровневых событий, необходимы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре, посвященном памяти О.Г. Строевой и В.И. Миташова, приведены полученные с помощью современных методов свидетельства, подтверждающие ранее заложенную ими в основе работы гипотезу о “переключении работы генов”, как базового явления процесса клеточной конверсии. За последние два десятилетия, осуществлены исследования, раскрывающие сложные молекулярные механизмы явления. Обнаружены ключевые гены и белки, определяющие исходную меланогенную, эпителиальную дифференцировку РПЭ и вновь возникающие при конверсии нейральную, глиальную и спектр мезенхимных дифференцировок как *in vivo*, так и *in vitro*. Определены системы внутриклеточных перестроек цитоскелета, клеточной поверхности и ВКМ, а также изменения молекулярных межклеточных взаимоотношений в слое РПЭ и с прилежащими тканями за его пределами. Выявлены регуляторные механизмы процесса конверсии РПЭ в терминах работы цитокинов, ростовых факторов и их сигнальных путей. И, наконец, начаты исследования изменений эпигенетического ландшафта и других условий экспрессии генов в ходе конверсии клеток РПЭ, в перспективе открывающих возможность экспериментального “переключения работы генов”. По-видимому, этот аспект изучения процесса трансдифференцировки, как и дальнейшее выстраивание сетей его регулирования, а также поиск их ключевых молекулярных участников — представляет собой логическое продолжение направления, заложенного в

свое время О.Г. Строевой и В.И. Миташовым. Параллельные исследования стратегии трансдифференцировки клеток РПЭ в мезенхимном направлении у млекопитающих *in vivo* дают возможность не только сопоставления двух различных молекулярных стратегий РПЭ (ведущих к регенерации сетчатки у амфибий и патологии у млекопитающих), но и для попытки моделирования условий, перmissive для регенерации сетчатки и запрещающих развитие патологии.

Исследование регенерации сетчатки за счет РПЭ имеет и другие важные точки современных приложений. Оно необходимо для понимания способов репрограммирования *in vivo* (naturally regulated reprogramming), способов индукции мультипотентности, а также способов обретения клетками полноценной, стабилизированной нейральной дифференцировки. Важно, что клетки РПЭ у *Urodela* и высших позвоночных обнаруживают сходство по многим своим свойствам, а потому дальнейшее изучение и понимание сходств и отличий на молекулярном уровне двух различных стратегий конверсии клеток, имеющих один и тот же фенотип, более чем уместно. Оно, в свою очередь, требует введения в обиход дополнительных современных методов изучения, в том числе исследования транскриптомов отдельных клеток в динамике развития процесса трансдифференцировки, методов определения и индукции генетической и эпигенетической модификаций и других.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, № 0088-2021-0017.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдонин П.П., Григорян Э.Н., Маркитантова Ю.В. Транскрипционный фактор Pitx2: локализация при регенерации сетчатки тритона // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. Т. 435. № 3. С. 283–288 (Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Markitantova Y.V. Transcriptional factor Pitx2: localization during newt retina regeneration // *Biology Bulletin*. 2010. V. 37. № 3. P. 231–235).
- Авдонин П.П., Маркитантова Ю.В., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Экспрессия регуляторных генов Pax6, Otx2, Six3 и FGF2 в процессе регенерации сетчатки у тритона // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 4. С. 414–421 (Avdonin P.P., Markitantova Yu.V., Zinovieva R.D., Mitashov V.I. Expression of regulatory genes Pax6, Otx2, Six3, and FGF2 during newt retina regeneration // *Biology Bulletin*. 2008. V. 35. P. 355).
- Григорян Э.Н. Полная отслойка сетчатки вызывает изменения экспрессии цитокератинов в клетках пигментного эпителия сетчатки у тритонов // Известия РАН. Сер. биологическая. 1995. № 4. С. 412–421 (Grigoryan E.N. The complete neural retina detachment induces the changes of cytokeratin expression in retinal pigmented epithelium cells in newts // *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* № 4. P. 412–421).
- Григорян Э.Н. Высокая регенерационная способность хвостатых амфибий (*Urodela*) как результат проявления половозрелыми животными ювенильных черт // Онтогенез. 2016. Т. 1. С. 83–92. (Grigoryan E.N. High regenerative ability of tailed amphibians (*Urodela*) as a result of the expression of juvenile traits be mature animals // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2016. V. 47. № 2. P. 83–92).
- Григорян Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации “молодого фенотипа” клеток-источников регенерации тканей глаза // Биохимия. 2018. Т. 83. № 11. С. 1627–1642 (Grigoryan E.N. Molecular factors of the maintenance and activation of the juvenile phenotype of cellular sources for eye tissue regeneration // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. P. 1627–1642).
- Григорян Э.Н. Факторы компетенции клеток ретинального пигментного эпителия для репрограммирования в нейрональном направлении при регенерации сетчатки у тритона // Известия РАН. Серия биологическая. 2014. № 1. С. 5–16 (Grigoryan E.N. Competence factors of retinal pigment epithelium cells for reprogramming in the neuronal direction during retinal regeneration in newts // *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* 2015. V. 1. P. 5–16).
- Григорян Э.Н., Антон Г.Д. Появление и распределение белка нейрофиламентов НФ-200 в трансдифференцирующихся клетках пигментного эпителия и других клетках глаза в процессе регенерации сетчатки у тритонов // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 4. С. 39–52 (Grigoryan E.N., Anton H.J. An appearance and distribution of neurofilament proteins (NF-200) in transdifferentiating retinal pigment cells and other eye cells during the process of neural retina regeneration in newts // *Russian J. Developmental Biology*. 1993. V. 24. № 4. P. 39–52).
- Григорян Э.Н., Антон Г.Дж. Анализ экспрессии кератинов в клетках пигментного эпителия сетчатки у

- процессе их трансдифференцировки у тритонов // Онтогенез. 1995. Т. 26. № 4. С. 310–323. (Grigoryan E.N., Anton H.J. The appearance and distribution of the NF-200 neurofilament protein in transdifferentiating cells of the pigment epithelium and in other eye cells during retinal regeneration in tritons // Russian J. Developmental Biology. 1993. V. 24. № 4. P. 39–52).
- Григорян Э.Н., Миташов В.И. Радиоавтографическое исследование пролиферации и синтеза меланина в клетках пигментного эпителия при регенерации глаза у тритонов // Онтогенез. 1979. Т. 10. № 2. С. 137–144 (Grigoryan E.N., Mitashov V.I. Radioautographic investigation of proliferation and melanin synthesis in retinal pigment epithelium cells during eye regeneration in newts // Russian J. Developmental Biology. 1979. V. 10. № 2. P. 137–144).
- Григорян Э.Н., Дольникова А.Е., Белкин В.М. Распределение фибронектина в процессе трансдифференцировки и пролиферации клеток глаза после отслойки сетчатки и удаления хрусталика у тритонов // Онтогенез. 1990. Т. 21. № 4. С. 403–408 (Grigoryan E.N., Dol'nikova A.E., Belkin V.M. Fibronectin distribution during the transdifferentiation and proliferation of eye cells after retinal detachment and removal of the crystalline lens in newts // Russian J. Developmental Biology. 1990. V. 21. P. 403–408).
- Кузнецова А.В., Григорян Э.Н., Александрова М.А. Ретинальный пигментный эпителий глаза взрослого человека – потенциальный источник клеток для восстановления сетчатки // Цитология. 2011. Т. 53. С. 505–512 (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).
- Лопашов Г.В., Строева О.Г. Развитие глаза в свете экспериментальных исследований. М.: Изд. АН СССР. 1963. 205 с.
- Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н., Зиновьева Р.Д. Идентификация в регенерирующей сетчатке тритона гена-регулятора эмбриогенеза *Pitx1* // Доклады академии наук. 2010. Т. 435. № 3. С. 420–423 (Markitantova Yu.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Zinovieva R.D. Identification of the *Pitx1* embryogenesis regulatory gene in a regenerating newt retina // Doklady Biological Sciences. 2010. V. 435(1): 421–424).  
<https://doi.org/10.1134/S0012496610060141>
- Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты сигнального пути FGF2 в тканях заднего сектора у взрослых тритонов *Pleurodeles waltl* // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. 41. С. 297–305 (Markitantova Yu.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N. FGF2 signaling pathway components in tissues of the posterior eye sector in the adult newt *Pleurodeles waltl* // Biol. Bull. 2014. V. 41. P. 297–305).
- Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Экспрессия нуклеостемина в процессе репрограммирования *in situ* клеток пигментного эпителия глаза при регенерации сетчатки у взрослого тритона // Цитология. 2014. Т. 56. № 9. С. 671–672.
- Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Идентификация гена нуклеостемина в тканях глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* // Известия РАН. Сер. биол. 2015. № 5. С. 453–460.
- Маркитантова Ю.В., Макарьев Е.О., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Исследование паттерна экспрессии регуляторных генов *Pax6*, *Prox1* и *Six3* в ходе регенерации структур глаза тритона // Известия РАН. Сер. биол. 2004. № 5. С. 522–531 (Markitantova Yu.V., Makar'ev E.O., Smirnova Yu.A., Zinovieva R.D., Mitashov V.I. Analysis of the expression pattern of regulatory genes *Pax6*, *Prox1*, and *Six3* during regeneration of eye structures in the newt // Izv. Akad. Nauk Ser. Biol. 2004. (5): 522–531).
- Маркитантова Ю.В., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Реорганизация хроматина в процессе репрограммирования пигментного эпителия при регенерации сетчатки тритона // Материалы международной конференции Хромосома-2015. С. 123–124.
- Маркитантова Ю.В., Смирский В.Н. Роль редокс-системы в инициации регенерационного ответа нейральных тканей глаза позвоночных // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 19–34. (Markitantova Yu.V., Simirskii V.N. Role of the redox system in initiation of a regenerative response of neural eye tissues in vertebrates // Russian J. Developmental Biology. 2020. V. 51. № 1. P. 16–30).  
<https://doi.org/10.1134/S106236042001004X>
- Миташов В.И. Динамика синтеза ДНК в пигментном эпителии в процессе восстановления глаза после хирургического удаления сетчатки у взрослых гребенчатых тритонов (*Triturus cristatus*) // Цитология. 1969а. Т. 11. № 4. С. 434–446.
- Миташов В.И. Характеристика митотических циклов клеток пигментного эпителия и зачатка сетчатки у взрослых тритонов (*Triturus cristatus*, *Triturus taeniatus*) // Докл. АН СССР. 1969б. Т. 189. № 3. С. 666–669.
- Миташов В.И. Динамика синтеза ДНК в клетках пигментного эпителия взрослых тритонов при восстановлении глаза после перерезки зрительного нерва и кровеносных сосудов // Цитология. 1970. Т. 12. № 12. С. 1521–1529.
- Миташов В.И. Пролиферация клеток пигментного эпителия сетчатки взрослых тритонов на поздних стадиях восстановления удаленной сетчатки // Онтогенез. 1974. Т. 5. № 1. С. 80–83.
- Милюшина Л.А., Кузнецова А.В., Григорян Э.Н., Александрова М.А. Фенотипическая пластичность клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro* // Клеточные технол. биол. мед. 2009. Т. 2. С. 71–76.
- Николаев А.А., Маркитантова Ю.В., Григорян Э.Н. Характеристика некоторых молекулярно-генетических и эпигенетических событий при регенерации сетчатки у *Urodella* путем репрограммирования РПЭ // Гены и клетки. 2017. Т. 12. № 3. С. 178.
- Николаев А.А. Эпигенетические особенности репрограммирования пигментного эпителия при регенерации сетчатки глаза после фотоиндуцированной отслойки у тритона *Pleurodeles waltl* // Выпускная

- квалификационная работа бакалавра. М.: МГУ, 2018. 92 с.
- Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Алейникова К.С., Григорян Э.Н. Исследование локализации накопления клеток в S-фазе в сетчатке глаза тритона *Pleurodeles waltlii* после искусственной отслойки от пигментного эпителия // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 143–150 (Novikova I.P., Poplinskaia V.A., Aleinikova K.S., Grigorian E.N. A study of the localization and accumulation of S-phase cells in the retina of newt *Pleurodeles waltli* after experimental pigment epithelial detachment // Russian J. Developmental Biology. 2008. V. 39. P. 116–121).
- Панова И.Г. Цитоструктура и цитохимия пигментного эпителия сетчатки // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 2. С. 165–190.
- Панова И.Г. Межфоторецепторный матрикс: развитие, состав и функциональное значение // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 1. С. 5–12.
- Ржанова Л.А., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Репрограммирование дифференцированного ретинального пигментного эпителия млекопитающих и человека: современные достижения и перспективы // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 4. С. 254–274 (Rzhanova L.A., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Reprogramming of differentiated mammalian and human retinal pigment epithelium: current achievements and prospects // Russian J. Developmental Biology. 2020. V. 51. № 4. P. 212–230).
- Свиштунов С.А., Миташов В.И. Радиоавтографическое исследование пролиферации клеток пигментного эпителия сетчатки у альбиносов шпорцевых лягушек // Онтогенез. 1983. Т. 14. С. 382–389.
- Строева О.Г. Морфогенез и врожденные аномалии глаза млекопитающих. М.: Наука, 1971. 242 с.
- Строева О.Г. Наследственные и экзогенные колобомы сетчатки и нормальный морфогенез глаза // Журн. общ. биол. 1961. Т. 22. С. 436–443.
- Строева О.Г., Миташов В.И. Дифференцировка и дедифференцировка пигментированных частей глаза позвоночных животных при метаплазии // Метаплазия тканей. М.: Наука, 1970. С. 93–105.
- Строева О.Г. Превращение пигментного эпителия в сетчатку на продвинутых стадиях эмбриогенеза крыс // Докл. Акад. Наук СССР. 1962. Т. 143. С. 991–993.
- Синицина В.Ф. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций при эмбриональном гистогенезе сетчатки мыши // Архив. анат., гистол., эмбриол. 1971. Т. 61. № 6. С. 58–67.
- Шафеев Е.В., Куринов А.М., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Репрограммирование клеток ретинального пигментного эпителия человека под влиянием bFGF *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 2. С. 128–136 (Shafei E.V., Kurinov A.M., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Reprogramming of human retinal pigment epithelial cells under the effect of bFGF *in vitro* // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. V. 163. 4. P. 574–582). <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3852-5>
- Шафеев Е.В., Ржанова Л.А., Новикова Ю.П., Куринов А.М., Григорян Э.Н., Александрова М.А., Кузнецова А.В. Ответ клеток ретинального пигментного эпителия человека на воздействие кондиционированных сред регенератов сетчаток тритона // Цитология. 2020. Т. 62. № 9. С. 728–743 (Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V. Response of human retinal pigment epithelial cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates // Tsitologiya. 2020. V. 62. № 9. P. 638–653).
- Abe T., Sato M., Tamai M. Dedifferentiation of the retinal pigment epithelium compared to the proliferative membranes of proliferative vitreoretinopathy // Curr. Eye Res. 1998. V. 17. № 12. P. 1103–1109.
- Abu El-Asrar A.M., van den Steen P.E., Al-Amro S.A. et al. Expression of angiogenic and fibrogenic factors in proliferative vitreoretinal disorders // Int. Ophthalmol. 2007. V. 27. P. 11–22.
- Abu El-Asrar A.M., Midena E., Al-Shabrawey M., Mohamad G. New developments in the pathophysiology and management of diabetic retinopathy // J. Diabetes Res. V. 2013. P. 2013: 424258.
- Alge C.S., Suppmann S., Priglinger S.G. et al. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. V. 44. № 8. P. 3629–3641.
- Ahlstromand J.D., Erickson C.A. The neural crest epithelial mesenchymal transition in 4D: a “tail” of multiple non-obligatory cellular mechanisms // Development. 2009. V. 136. № 11. P. 1801–1812.
- Aldiri I., Xu B., Wang L. et al. The dynamic epigenetic landscape of the retina during development, reprogramming, and tumorigenesis // Neuron. 2017. V. 94. № 3. P. 550–568.
- Al-Hussaini H., Vugler A., Semo M., Jeffery G. Mature mammalian retinal pigment epithelium cells proliferate *in vivo* // Mol. Vis. 2008. V. 14. P. 1784–1791.
- Alvarado S.A., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 873–884.
- Araki M. Regeneration of the amphibian retina: role of tissue interaction and related signaling molecules on RPE transdifferentiation // Develop. Growth Differ. 2007. V. 49. № 2. P. 109–120.
- Asato R., Yoshida S., Ogura A., Nakama T., Ishikawa K., Nakao S., Sassa Y., Enaida H., Oshima Y., Ikeo K. et al. Comparison of gene expression profile of epiretinal membranes obtained from eyes with proliferative vitreoretinopathy to that of secondary epiretinal membranes // PLoS One. 2013. V. 8. e54191.
- 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.
- Basinski B.W., Balikov D.A., Aksu D., Li Q., Rao R.C. Ubiquitous chromatin modifiers in congenital retinal diseases: Implications for disease modeling and regenerative medicine // Trends in Molecular Medicine. 2021. In press.

- Benayoun B.A., Caburet S., Veitia R.A.* Forkhead transcription factors: key players in health and disease // *Trends Genet.* 2011. V. 27. P. 224–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.003>
- Bharti K., Nguyen M.T., Skuntz S., Bertuzzi S., Arnheiter H.* The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. P. 380–394.
- Biscotti M.A., Carducci F., Barucca M. et al.* The transcriptome of the newt *Cynops orientalis* provides new insights into evolution and function of sexual gene networks in sarcopterygians // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 5445.
- Blenkinsop T.A., Saini J.S., Maminishkis A. et al.* Human adult retinal pigment epithelial stem cell-derived RPE monolayers exhibit key physiological characteristics of native tissue // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015. V. 56. № 12. P. 7085–7099.
- Blenkinsop T.A., Salero E., Stern J.H., Temple S.* The culture and maintenance of functional retinal pigment epithelial monolayers from adult human eye // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 945. P. 45–55.
- Bochaton-Piallat M.L., Kapetanios A.D., Donati G. et al.* TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$  receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. V. 41. P. 2336–2342.
- Boles N., Fernandes M., Swigut T., Srinivasan R. et al.* Epigenomic and transcriptomic changes during human RPE EMT in a stem cell model of epiretinal membrane pathogenesis and prevention by nicotinamide // *Stem Cell Reports.* 2020. V. 14. P. 631–647.
- Bonnans C., Chou J., Werb Z.* Remodelling the extracellular matrix in development and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2014. V. 15. P. 786–801.
- Bruckskotten M., Looso M., Reinhardt R., Braun T., Borchardt T.* Newt-omics: a comprehensive repository for omics data from the newt *Notophthalmus viridescens* // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40 (Database issue). P. D895–D900.
- Buchholz D.E., Pennington B.O., Croze R.H., Hinman C.R., Coffey P.J. et al.* Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium // *Stem Cells Transl. Med.* 2013. V. 2. P. 384–393.  
<https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163>
- Burke J.M.* Epithelial phenotype and the RPE: Is the answer blowing in the Wnt? // *Prog. Retin. Eye Res.* 2008. V. 27. № 6. P. 579–595.
- Burke J.M., Hjelmeland L.M.* Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture // *Mol. Interv.* 2005. V. 5. P. 241.
- Burke J.M., Skumatz C.M., Irving P.E., McKay B.S.* Phenotypic heterogeneity of retinal pigment epithelial cells *in vitro* and *in situ* // *Exp. Eye Res.* 1996. V. 62. P. 63–73.
- Casaroli-Marano R.P., Pagan R., Vilario S.* Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999. V. 40. P. 2062–2072.
- Casco-Robles M.M., Islam M.R., Inami W. et al.* Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to re-generation by Pax6 in newts // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33761.
- Chen T., Dent S.Y.R.* Chromatin modifiers: regulators of cellular differentiation // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. № 2. P. 93–106.
- Chen Z., Shao Y., Li X.* The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR // *Mol. Vis.* 2015. V. 21. P. 706–710.
- Chen H.C., Zhu Y.T., Chen S.Y., Tseng S.C.* Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition // *Lab. Invest.* 2012. V. 92. P. 676–687.
- Chen X., Muller G.A., Quaaas M., Fischer M., Han N. et al.* The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. P. 227–236.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00881-12>
- Chiba C.* The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration // *Exp. Eye Res.* 2014. V. 123. P. 107–114.
- Chiba C., Mitashov V.I.* Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human* (Chiba Ch., ed.), Research Signpost, Kerala, India. 2007. P. 15–33.
- Chiba C., Hoshino A., Nakamura K. et al.* Visual cycle protein RPE65 persists in new retinal cells during retinal regeneration of adult newt // *J. Comp. Neurol.* 2006. V. 495. P. 391–407.
- Choudhary P., Dodsworth B.T., Sidders B., Gutteridge A., Michaelides C., Duckworth J.K. et al.* A FOXM1 dependent mesenchymal-epithelial transition in retinal pigment epithelium cells // *PLoS One.* 2015. 10(6): e0130379.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130379>
- Chow R.L., Lang R.A.* Early eye development in Vertebrates // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. V. 17. P. 255–262.
- Chitchevlova L.A., Ohlmann A., Boytsov D. et al.* Nanoscopic approach to study the early stages of epithelial to mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro* // *Life (Basel).* 2020. V. 10. № 8. P. 128.
- Connor T.B., Jr., Roberts A.B., Sporn M.B. et al.* Correlation of fibrosis and transforming growth factor- $\beta$  type 2 levels in the eye // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. P. 1661–1666.
- Corso-Díaz X., Jaeger C., Chaitankar V., Swaroop A.* Epigenetic control of gene regulation during development and disease: A view from the retina // *Prog. Retin. Eye Res.* 2018. V. 65. P. 1–27.
- Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B.* Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts // *Cell.* 1987. V. 51. P. 987–1000.
- Defoe D.M., Grindstaff R.D.* Epidermal growth factor stimulation of RPE cell survival: Contribution of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways // *Exp. Eye Research.* 2004. V. 79. № 1. P. 51–59.

- Du L., Yamamoto S., Burnette B.L., Huang D., Gao K., Jamshidi N., Kuo M.D. Transcriptome profiling reveals novel gene expression signatures and regulating transcription factors of TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition // *Cancer Med.* 2016. V. 5. P. 1962–1972.
- Durairaj C., Chastain J.E., Kompella U.B. Intraocular distribution of melanin in human, monkey, rabbit, minipig and dog eyes // *Exp. Eye Res.* 2012. V. 98. № 1. P. 23–27.
- Dvashi Z., Goldberg M., Adir O. et al. TGF-β1 induced transdifferentiation of RPE cells is mediated by TAK1 // *PLoS One.* 2015. 10:e0122229.
- Dvorientchikova D., 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. P. 3860.
- Eguchi G. Transdifferentiation in pigmented epithelial cells of vertebrate eyes in vitro // *Mechanisms of Cell Change* / Eds. Ebert J.D., Okada T.S. N.Y. Wiley, 1979. P. 273–291.
- Eguchi G. // Transdifferentiation and instability in cell commitment / Eds. Okada T.S., Kondoh H. Yamada Science Foundation, 1986. 433 p.
- 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. P. 98–111.
- Evans A.L., Gage P.J. Expression of the homeobox gene *Pitx2* in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 22. P. 3347–3359. Epub 2005 Oct 3. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi365>
- Faktorovich E., Steinberg R., Yasumura D. et al. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat // *J. Neuroscience.* 1992. V. 12. № 9. P. 3554–3560.
- Farjood F., Vargis E. Physical disruption of cell–cell contact induces VEGF expression in RPE cells // *Mol. Vis.* 2017. V. 23. P. 431–446.
- Faunes F., Gundermann D.G., Munoz R. et al. The heterochronic gene *Lin28* regulates amphibian metamorphosis through disturbance of thyroid hormone function // *Dev. Biol.* 2017. V. 425. P. 142–151.
- Feist R.M., Jr., King J.L., Morris R., Witherspoon C.D., Guidry C. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy // *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2014. V. 52. P. 347–357.
- Fernandez-Robredo P., Sancho A., Johnen S. et al. Current treatment limitations in age-related macular degeneration and future approaches based on cell therapy and tissue engineering // *J. Ophthalmology.* 2014. Article ID510285. P. 13.
- Flood M.T., Gouras P., Kjeldbye H. Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1980. P. 19. P. 1309–1320.
- Fuchs H.R., Meister P., Lotke R., Framme C. The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFβ-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // *Exp. Eye Res.* 2020. V. 201. P. 108258.
- Fuhrmann S., Zou C.J., Levine E.M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis // *Exp. Eye Res.* 2014. V. 0. P. 141–150.
- Galy A., Nreron B., Planque N., Saule S., Eychéne A. Activated MAPK/ERK kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina // *Dev. Biol.* 2002. V. 248. № 2. P. 251–264.
- Garcia-Ramírez M., Hernández C., Villarroel M. et al. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy // *Diabetologia.* 2009. V. 52. № 12. P. 2633–2641.
- Gallina D., Palazzo I., Steffenson L. et al. Wnt/β-catenin signaling and the formation of Muller glia-derived progenitors in the chick retina // *Dev. Neurobiol.* 2016. V. 76. № 9. P. 983–1002.
- Garweg J.G., Tappeiner C., Halberstadt M. Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment // *Survey of Ophthalmology.* 2013. V. 58. P. 321–329.
- Geller S.F., Lewis G.P., Fisher S.K. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: Reactive Muller and RPE cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. P. 1363–1369.
- Georgiadis A., Tschernutter M., Bainbridge J.W.B. et al. The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. P. e15730.
- Grigoryan E.N. Shared triggering mechanisms of retinal regeneration in lower vertebrates and retinal rescue in higher ones // *Tissue Regeneration – from Basic Biology to Clinical Application* / Ed. Davies J. In Tech. Croatia, 2012. P. 145–164.
- Grigoryan E.N. Potential endogenous cell sources for retinal regeneration in vertebrates and humans: Progenitor traits and specialization // *Biomedicines.* 2020. V. 8. P. 208.
- Grigoryan E.N. Study of natural longlife juvenility and tissue regeneration in caudate amphibians and potential application of resulting data in biomedicine // *J. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 2.
- Grigoryan E.N., Markitantova Y.V. Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (RPE) natural reprogramming during retinal regeneration in Urodela // *Biomedicines.* 2016. V. 4. P. 10–28.
- Graw J. Eye development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2010. V. 90. P. 343–386. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90010-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90010-0)
- Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1962. V. 10. P. 622–640.
- Han J.W., Lyu J., Park Y.J. et al. Wnt/β-catenin signaling mediates regeneration of retinal pigment epithelium after laser photocoagulation in mouse eye // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015. V. 56. P. 8314–8324.
- Hasegawa M. Restitution of the eye after removal of the retina and lens in the newt *Triturus pyrrhogaster* // *Embryologia.* 1958. V. 4. P. 1–32.
- Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it // *Dev. Dynamics.* 2005. V. 233. № 3. P. 706–720.

- Hayashi T., Carthew R.W. Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina // *Nature*. 2004. V. 7. № 431(7009):647–52.  
<https://doi.org/10.1038/nature02952>
- Haynes T., Luz-Madrigo A., Reis E.S. et al. Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2312.
- Hecquet C., Lefevre G., Valtink M. et al. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. P. 3091–3098.
- Hiscott P., Sheridan C., Magee R.M., Grierson I. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease // *Prog. Ret. Eye Res.* 1999. V. 18. P. 167–190.
- Holliday R. Epigenetics: a historical overview // *Epigenetics*. 2006. V. 1. P. 76–80.
- Hu J., Bok D. A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers // *Mol. Vis.* 2001. V. 7. P. 14–19.
- Hua X., Liu X., Ansari D.O., Lodish H.F. Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3084–3095.
- Huang X., Wei Y., Ma H., Zhang S. Vitreous-induced cytoskeletal rearrangements via the Rac1 GTPase-dependent signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. V. 419. № 2. P. 395–400.
- Idrees S., Sridhar J., Kuriyan A.E. Proliferative vitreoretinopathy: A review // *Int. Ophthalmol. Clin.* 2019. V. 59. № 1. P. 221–240.
- Imamichi Y., Menke A. Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition // *Cells Tissues Organs*. 2007. V. 185. № 1–3. P. 180–190.
- 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.
- Ishida W., Mori Y., Lakos G. et al. Intracellular TGF-β receptor blockade abrogates smad-dependent fibroblast activation *in vitro* and *in vivo* // *J. Investigative Dermatology*. 2006. V. 126. № 8. P. 1733–1744.
- Itoh Y., Kimoto K., Imaizumi M., Nakatsuka K. Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells // *Experimental Eye Research*. 2007. V. 84. № 3. P. 464–472.
- Jopling C., Sleep E., Raya M. et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation // *Nature*. 2010. V. 464. P. 606–609.
- Jopling C., Boue S., Ispizua B.J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 12. P. 79–89.
- Kaneko J., Chiba Ch. Immunohistochemical analysis of Musashi-1 expression during retinal regeneration of adult newt // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 450. P. 252–257.
- Kaneko Y., Matsumoto G., Hanyu Y. The occurrence of apoptosis during retinal regeneration in adult newts // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1999. V. 117. № 2. P. 225–228.
- Kaneko Y., Hirota K., Matsumoto G., Hanyu Y. Expression pattern of a new Notch homologue in regenerating newt retina // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001. V. 31. P. 1, 53–62, 128.
- Kandyba E., Leung Y., Chen Y.B., Widelitz R., Chuong C.M. et al. Competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling reveals a robust gene network ruling stem cell homeostasis and cyclic activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 1351–1356.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1121312110>
- Kang Y., Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis // *Cell*. 2004. V. 118. P. 277–279.
- Keefe J.R. An analysis of urodelean retinal regeneration // *J. Exp. Zool.* 1973. V. 184. P. 185–257.
- Kiilgaard J.F., Prause J.U., Prause M. et al. Subretinal posterior pole injury induces selective proliferation of RPE cells in the periphery in *in vivo* studies in pigs // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 1. P. 355–360.
- Kigasawa K., Ishirawa H., Obazawa H., Minamoto T., Nagai Y., Tanaka Y. Collagen production by cultured human retinal pigment epithelial cells // *Tokai J. Experimental and Clinical Medicine*. 1998. V. 23. № 3. P. 147–151.
- Kimoto K., Nakatsuka K., Matsuo N., Yoshioka H. p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF-beta 2 in human retinal pigmented epithelial cells ARPE-19 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. P. 2431–2437.
- Kimura Y., Madhavan M., Call M.K. et al. Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration // *J. Immunol.* 2003. V. 170. P. 2331–2339.
- Kirchhof B., Sorgente N. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages // *Dev. Ophthalmol.* 1989. V. 16. P. 1–53.
- Kita T., Hata Y., Arita R., Kawahara S., Miura M., Nakao S., Mochizuki Y., Enaida H., Goto Y., Shimokawa H., Hafezi-Moghadam A., Ishibashi T. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 17504–17509.
- 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>
- Korthagen N.M., van Bilsen K., Swagemakers S.M., van de Peppel J., Bastiaans J., van der Spek P.J., van Hagen P.M., Dik W.A. Retinal pigment epithelial cells display specific transcriptional responses upon TNF-alpha stimulation // *Br. J. Ophthalmol.* 2015. V. 99. P. 700–704.
- Lazarus H., Hageman G. Xyloside-induced disruption of interphosphoreceptor matrix proteoglycans results in retinal

- detachment // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992. V. 33. № 2. P. 364–376.
- Lee S.C., Kwon O.W., Seong G.J. et al. Epithelio-mesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells // *Ophthalmic Res.* 2001. V. 33. P. 80–86.
- Lee H., O'Meara S.J., O'Brien C., Kane R. The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. P. 4291–4299.
- Li J., Tang X., Chen X. Comparative effects of TGF- $\beta$ 2/Smad2 and TGF $\beta$ 2/Smad3 signaling pathways on proliferation, migration, and extracellular matrix production in a human lens cell line // *Exp. Eye. Res.* 2011. V. 92. P. 173–179.
- Li S., Zhang H., Wang A. et al. Differentiation of adult human retinal pigment epithelial cells into dopaminergic-like cells in vitro and in the recipient monkey brain // *Mol. Med.* 2019. V. 25. P. 9.
- Li M., Li H., Liu X. et al. MicroRNA-29b regulates TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 // *Exp. Cell. Res.* 2016. V. 345. P. 115–124.
- Lopashov G.V., Stroeva O.G. Morphogenesis of the Vertebrate eye // *Advances in Morphogenesis.* Academic Press: N.Y. USA; London. UK, 1961. V. 1. P. 231–377.
- Lynn S.A., Gareth W., Keeling E., Scott J.A., Cree A.J., Johnston D.A., Page A., Cuan-Urquizo E., Bhaskar A., Groschel M.C., Tumbarello D.A., Newman T.A., Lotery A.J., Ratnayaka J.A. Ex-vivo models of the Retinal Pigment Epithelium (RPE) in long-term culture faithfully recapitulate key structural and physiological features of native RPE // *Tissue and Cell.* 2017. V. 49. P. 447–460.
- Lopez P.F., Yan Q., Kohen L. et al. Retinal pigment epithelial wound healing *in vivo* // *Arch. Ophthalmol.* 1995. V. 113. P. 1437–1446.
- Maeda M., Johnson K.R., Wheelock M.J. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 873–887.
- Maki N., Suetsugu-Maki R., Tarui H., Agata K., Del Rio-Tsonis K., Tsonis P.A. Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in newts // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238(6):1613–6. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21959>
- Markitantova Yu., Makariev E., Pavlova G., Zinovieva R.D., Mitashov V. Location of the Prox1 gene expression during newt lens and retina regeneration // *Doklady Biological Sciences.* 2003. V. 391. № 4. P. 361–364. <https://doi.org/10.1023/A:1025119121348>
- Markitantova Yu.V., Makar'ev E.O., Smirnova Yu.A., Zinovieva R.D., Mitashov V.I. Study of expression pattern of regulatory Genes Rax6, Rrox1, and Six3 during regeneration of newt eye structures // *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2004. № 5. P. 522–531.
- Markitantova Y.V., Novikova Y.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. Expression of FGF2 and nucleostemin in models of retinal regeneration in the newt under conditions of 3D organotypic culture *in vitro* // *EC Ophthalmology.* 2020. V. 10. № 12. P. 01–09. <https://doi.org/10.31080/ecop.2020.11.00580>
- Markitantova Yu.V., Simirskii V.N. Inherited retinal diseases through the eyes of homeobox genes // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 5. P. 1602. <https://doi.org/10.3390/ijms21051602>
- Mercer S.E., Cheng C-H., Atkinson D.L., Krcmery J., Guzman C.E., Kent D.T. et al. Multi-tissue microarray analysis identifies a molecular signature of regeneration // *PLoS ONE.* 2012. V. 7. № 12: e52375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052375>
- Merrell A.J., Stanger B.Z. Adult cell plasticity *in vivo*: transdifferentiation is back in style // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 17. № 7. P. 413–425.
- Meyers J.R., Hu L., Moses A. et al.  $\beta$ -Catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina // *Neural. Dev.* 2012. V. 24. № 7. P. 30.
- Mills J.C., Stanger B.Z., Sander M. Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? // *EMBO J.* 2019. V. 38. P. e103148.
- Milyushina L.A., Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A. Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. V. 151. № 4. P. 506–511.
- Milyushina L.A., Verdiev B.I., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 153. P. 157.
- Mirabella A.C., Foster B.M., Bartke T. Chromatin deregulation in disease // *Chromosoma.* 2016. V. 125. P. 75–93.
- Mitashov V.I. Mechanisms of retina regeneration in vertebrates // *Int. J. Develop. Biol.* 1996. V. 40. P. 833–844.
- Mitashov V.I. Retinal regeneration in amphibians // *Int. J. Develop. Biol.* 1997. V. 41. P. 893–905.
- Mitashov V.I. Patterns of changes in mitotic cycles during cell transformation and regeneration in lower vertebrates // *Tsitologiya.* 1980. V. 2. P. 371–380.
- Mitashov V.I. Arsanto J.P., Markitantova Y.V., Thouveny Y. Remodelling processes during neural retina regeneration in adult urodeles: An immunohistochemical survey // *Int. J. Develop. Biol.* 1995a. V. 39. P. 993–1003.
- Mitashov V.I. Expression of regulatory and tissue-specific genes controlling the regeneration potential of vertebrate eye tissues // *Ontogenez.* 2007. V. 38. № 4. P. 1–10.
- Mizuno A., Yasumuro H., Yoshikawa T. et al. MEK-ERK signaling in adult newt retinal pigment epithelium cells is strengthened immediately after surgical induction of retinal regeneration // *Neurosci. Lett.* 2012. V. 523. P. 39–44.
- Morescalchi F., Duse S., Gambicorti E. et al. Proliferative vitreoretinopathy after eye injuries: an overexpression of growth factors and cytokines leading to a retinal keloid // *Mediators Inflamm.* 2013. P. 269787.
- Nakamura K., Chiba Ch. Evidence for Notch signaling involvement in retinal regeneration of adult newt // *Brain Res.* 2007. V. 1136. № 1. P. 28–42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17217933/> – affiliation-1
- Nakamura K., Islam Md.R., Takayanagi M. et al. Transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt *Cynops pyrrhogaster* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10: e109831.

- Nazarieh M., Wiese A., Will T., Hamed M., Helms V.* Identification of key player genes in gene regulatory networks // *BMC Syst. Biol.* 2016. V. 10. P. 88.
- Nieto M.A.* The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. V. 27. P. 347–376.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>
- Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F. et al.* The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators // *Nature.* 2018. V. 554. P. 50–55.
- Oliver V.F., van Bysterveldt K.A., Merbs S.L.* Chapter 22 – epigenetics in ocular medicine // *Medical Epigenetics.* Academic press. 2016. P. 391–412.
- Okada T.S.* “Transdifferentiation” of cells from chick embryonic eye tissues in cell culture // *Dev. Growth Differ.* 1975. V. 17. P. 289–290.
- Okada T.S.* Cellular metaplasia or transdifferentiation as a model for retinal cell differentiation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1980. V. 16. P. 349–380.
- Okada T.S.* Transdifferentiation. Oxford. Clarendon Press, 1991. 238 p.
- Pannu J., Nakerakanti S., Smith E., Ten Dijke P., Trojanowska M.* Transforming growth factor- $\beta$  receptor type independent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways // *J. Biological Chemistry.* 2007. V. 282. № 14. P. 10405–10413.
- Parmeggiani F., Campa C., Costagliola C. et al.* Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications // *Mediators of Inflamm.* 2010: 546826.
- Pastor J.C., de la Rúa E.R., Martin F.* Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology // *Prog. Retin. Eye Res.* 2002. V. 21. P. 127–144.
- Pastor J.C., Rojas J., Pastor-Idoate S. et al.* Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences // *Prog. Ret. Eye Res.* 2016. V. 51. P. 125–155.
- Philp N.J., Nachmias V.T.* Polarized distribution of integrin and fibronectin in retinal pigment epithelium // *Invest. Ophthalmology and Visual Science.* 1987. V. 28. № 8. P. 1275–1280.
- Popova E.Y., Barnstable C.J.* Chapter 15 – Insights into the epigenetics of retinal development and diseases // *Epigenetic and Regeneration.* V. 11 in *Translational Epigenetics.* Academic Press. 2019. P. 355–383.
- Powell C., Grant A.R., Cornblath E., Goldman D.* Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 19814–19819.
- Pratt Craig H., Vadigepalli R., Chakravarthula P., Gonye G.E., Philp N.J., Grunwald G.B.* Transcriptional regulatory network analysis during epithelial-mesenchymal transformation of retinal pigment epithelium // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 1414–1428.
- Qu K., Xu X., Liu C., Wu Q., Wei J. et al.* Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma // *Cancer Lett.* 2013. V. 331. P. 105–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.008>
- Rattner A., Toulabi, L., Williams J. et al.* The genomic response of the retinal pigment epithelium to light damage and retinal detachment // *J. Neuroscience.* 2008. V. 28. P. 9880–9889.
- Remé C., Grimm C., Hafezi F. et al.* Why study rod cell death in retinal degenerations and how? // *Documenta Ophthalmologica.* 2003. V. 106. № 1. P. 25–29.
- Roybal C.N., Velez G., Toral M.A., Tsang S.H., Bassuk A.G., Mahajan V.B.* Personalized proteomics in proliferative vitreoretinopathy implicate hematopoietic cell recruitment and mTOR as a therapeutic target // *Am. J. Ophthalmol.* 2018. V. 186. P. 152–163.
- Saika S., Kono-Saika S., Tanaka T. et al.* Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice // *Lab. Invest.* 2004. V. 84. P. 1245–1258.
- Saika S., Yamanaka O., Nishikawa-Ishida I. et al.* Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model // *Arch. Ophthalmol.* 2007. V. 125. P. 647–654.
- Saika S., Yamanaka O., Okada Y. et al.* TGF $\beta$  in fibroproliferative diseases in the eye // *Frontiers in Bioscience – Scholar.* 2009. V. 1. № 1. P. 376–390.
- Saini J.S., Corneo B., Miller J.D., Kiehl T.R., Wang Q., Boles N.C., Blenkinsop T.A., Stern J.H., Temple S.* Nicotinamide ameliorates disease phenotypes in a human iPSC model of age-related macular degeneration // *Cell Stem Cell.* 2017. V. 20. P. 635–647. e7.
- Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 10. P. 88–95.
- Sakami S., Hisatomi O., Sakakibara S., Liu J.* Downregulation of Otx2 in the dedifferentiated RPE cells of regenerating newt retina // *Dev. Brain Res.* 2005. V. 155. P. 49–59.
- Schiff L., Boles Nathan C., Fernandes M., Nachmani B., Gentile R., Blenkinsop T.A.* P38 inhibition reverses TGF $\beta$ 1 and TNF $\alpha$ -induced contraction in a model of proliferative vitreoretinopathy // *Communications Biology.* 2019. 2:162.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0406-6>
- Schmidt S.Y., Peisch R.D.* Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1986. V. 27. P. 1063–1067.
- Shu D.Y., Lovicu F.J.* Myofibroblast transdifferentiation: the dark force in ocular wound healing and fibrosis // *Prog. Ret. Eye Res.* 2017. V. 60. P. 44–65.
- Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C.P.* The retinal pigment epithelium in health and disease // *Curr. Mol. Med.* 2010. V. 10. P. 802–823.
- Spraul C.W., Kaven C., Lang G.K., Lang G.E.* Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation // *Ophthalmic Res.* 2004. V. 36. P. 166–171.
- Stern J., Temple S.* Retinal pigment epithelial cell proliferation // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2015. V. 240. № 8. P. 1079–1086.

- Sherpa T., Lankford T., McGinn T.E., Hunter S.S., Frey R.A., Sun Chi, Ryan M., Robison B.D., Stenkamp D.L.* Retinal regeneration is facilitated by the presence of surviving neurons // *Develop. Neurobiol.* 2014. V. 74. P. 851–876. <https://doi.org/10.1002/dneu.22167>
- Sousounis K., Looso M., Maki N., Ivester C.J., Braun T., Tsounis P.A.* Transcriptome analysis of newt lens regeneration reveals distinct gradients in gene expression patterns // *PLoS One.* 2013. V. 8(4): e61445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061445>
- Stevenson B.R., Siliciano J.D., Mooseker M.S., Goode-nough D.A.* Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia // *J. Cell Biol.* 1986. V. 103. P. 755–766.
- Stewart S., Gomez A.W., Armstrong B.E., Henner A., Stankunas K.* Sequential and opposing activities of Wnt and BMP coordinate zebrafish bone regeneration // *Cell Report.* 2014. V. 6. P. 482–498. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.010>
- Strauss O.* The retinal pigment epithelium in visual function // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 3. P. 845–888.
- Stroeva O.G., Mitashov V.I.* Developmental potential of vertebrate eye tissues in regeneration of retina and lens // *Problems of Developmental Biology.* M.: Mir Publ., 1981. P. 168–207.
- Stroeva O.G., Mitashov V.I.* Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration // *Int. Rev. Cytol.* 1983. V. 83. P. 221–293.
- Stocks S.Z., Taylor S.M., Shiels I.A.* Transforming growth factor-beta1 induces alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin synthesis in cultured human retinal pigment epithelial cells // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2001. V. 29. P. 33–37.
- Strunnikova N.V., Maminishkis A., Barb J.J.* Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. P. 2468–2486.
- Sun S., Fang J.* Epigenetic regulation of epithelia-mesenchymal transition // *Cell Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 23. P. 4493–4515.
- Susaki K., Chiba C.* Pigment MEK mediates in vitro neural transdifferentiation of the adult newt retinal pigment epithelium cells: Is FGF2 an induction factor? // *Cell Research.* 2007. V. 20. № 5. P. 364–379. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2007.00407.x>
- Szibor M., Poling J., Warnecke H. et al.* Remodeling and de-differentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration // *Cell Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. P. 1907–1916.
- Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Takahashi E., Nagano O., Ishimoto T., Yae T., Suzuki Y., Shinoda T., Nakamura S., Niwa S., Ikeda S., Koga H. et al.* Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 4060–4073.
- Tamiya S., Kaplan H.J.* Role of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Exp. Eye Res.* 2016. V. 142. P. 26–31.
- Tamiya S., Liu L., Kaplan H.J.* Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. P. 2755–2763.
- Tapscott S.J., Weintraub H.* MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. № 4. P. 1133–1138.
- Tapscott S.J., Davis R.L., Thayer M.J. et al.* MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts // *Science.* 1988. V. 242. P. 405–411.
- Thiery J.P., Sleeman J.P.* Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. P. 131–142.
- Tosi G.M., Marigliani D., Romeo N., Toti P.* Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge // *J. Cell. Physiol.* 2014. V. 229. P. 1577–1583.
- Uehara F., Ohba N., Ozawa M.* Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. P. 2164–2172.
- Vaajasaari H., Ilmarinen T., Juuti-Uusitalo K., Rajala K., Onnela N. et al.* Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells // *Mol. Vis.* 2011. V. 17. P. 558–575.
- VandenBosch L.S., Reh T.A.* Epigenetics in neuronal regeneration // *Sem. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 97. P. 63–73.
- Vadigepalli R., Chakravarthula P., Zak D.E., Schwaber J.S., Gonye G.E.* PAINT: a promoter analysis and interaction network generation tool for gene regulatory network identification // *OMICS.* 2003. V. 7. P. 235–252.
- Venters B.J., Pugh B.F.* How eukaryotic genes are transcribed // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2009. V. 44. № 2–3. P. 117–141.
- Veldman M.B., Bembem M.A., Thompson R.C., Goldman D.* Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration // *Dev. Biol.* 2007. V. 312. P. 596–612.
- Wang I.C., Chen Y.J., Hughes D., Petrovic V., Major M.L. et al.* Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 10875–10894.
- Wang Y., Shang Y.* Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 2. P. 160–169.
- Wiedemann P.* Growth factors in retinal disease: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration // *Surv. Ophthalmol.* 1992. V. 36. P. 373–384.
- Weintraub H., Tapscott S.J., Davis R.L.* Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 14. P. 5434–5438.

- Weissenfels N., Hündgen M. Changing adenosine triphosphatase activity in nuclei of cultured chicken heart myoblasts during their transdifferentiation // *Histochemie*. 1968. V. 16. P. 119–133.
- Wu J., Chen X., Liu X. et al. Autophagy regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelium cells // *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 17. P. 3607–3614.
- Xiao W., Chen X., Liu X. et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *Cell Mol. Med.* 2014. V. 18. № 4. P. 646–655.
- Xue J., Lin X., Chiu W.T., Chen Y.H., Yu G. et al. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF- $\beta$ -dependent cancer metastasis // *J. Clin. Invest.* 2014. V. 124. P. 564–579. <https://doi.org/10.1172/JCI71104>
- Yan X., Liu Z., Chen Y. Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7 // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2009. V. 41. № 4. P. 263–272.
- Yang S., Li H., Li M., Wang F. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Discov. Med.* 2015. V. 20. P. 207–217.
- Yao Y., Wang C.H. Dedifferentiation: inspiration for devising engineering strategies for regenerative medicine // *NPJ. Regen. Med.* 2020. V. 5. P. 14.
- Yasumuro H., Sakurai K., Toyama F. et al. Implications of a multi-step trigger of retinal regeneration in the adult newt // *Biomedicine*. 2017. V. 5. № 2. P. 25.
- Yoshii C., Ueda Y., Okamoto M., Araki M. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina // *Dev. Biol.* 2007. V. 303. № 1. P. 45–50.
- Yoshikawa T., Mizuno A., Yasumuro H. et al. MEK-ERK and heparin-susceptible signaling pathways are involved in cell-cycle entry of the wound edge retinal pigment epithelium cells in the adult newt // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012. V. 25. P. 66–82.
- Zhang W., Liu H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells // *Cell Res.* 2002. V. 12. P. 9–18.
- Zhou M., Geathers J.S., Grillo S.L. et al. Role of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium dysfunction // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. 8:501.
- Zou H., Shan C., Ma L. et al. Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy // *Peer J.* 2020. V. 8: e10136.

*In memory of our teachers O.G. Stroeveva and V.I. Mitashov*

## Molecular Strategies for Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells in Amphibians and Mammals *in vivo*

E. N. Grigoryan<sup>1,\*</sup> and Yu. V. Markitantova<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Kol'tsov Institute of Developmental Biology, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: leonore@mail.ru

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

Retinal pigment epithelium (RPE) is the cellular source for retinal regeneration *in vivo* in amphibians and for retinal diseases' development in mammals and human. The transdifferentiation is the basis for both processes of RPE transformation into cells of other phenotypes: in the first case – neural, in the second – mesenchymal. The review describes the main stages of RPE cells' transdifferentiation: the initiation of the process, cell migration and proliferation, dedifferentiation, reprogramming, and cell specialization in new directions. An information about the molecular and genetic mechanisms that ensure the passage of these stages by cells is provided. Molecular participants in the regulation of transdifferentiation by the whole organism, the local cellular microenvironment (growth factors, signaling cascades), by an expression of transcription factors, as well as by epigenome regulation are presented. Similarities and differences in the molecular-genetic mechanisms of implementation of different strategies for transdifferentiation of RPE in amphibians and mammals are noted. The investigation of molecular key participants in this choice serves both to develop the theory of cellular reprogramming and to develop approaches for the treatment of proliferative diseases of the human retina associated with RPE pathologies.

**Keywords:** eye, retina, pigment epithelium, transdifferentiation, regeneration, proliferative retinopathy, transcription factors, signal molecules, epigenome

УДК 574.32;581.4

## ПРОЯВЛЕНИЕ БИОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В ХОДЕ ОНТОГЕНЕЗА МЫШЕХВОСТНИКА МАЛЕНЬКОГО *MYOSURUS MINIMUS* L. (RANUNCULACEAE)

© 2021 г. М. В. Марков\*

Московский педагогический государственный университет,  
ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 1, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: markovsmail@gmail.com

Поступила в редакцию 27.02.2021 г.

После доработки 22.03.2021 г.

Принята к публикации 27.03.2021 г.

Показано своеобразие развития зародыша семени, морфологической и анатомической структуры побега и корневой системы особи у одного из самых мелких по размерам однолетних растений мышехвостника маленького на самых ранних и следующих за ними этапах онтогенеза. Обсуждается соответствие выявленной структуры (наличие у проростка коллета с ризоидами, аэренхимы в первичной коре гипокотыля и придаточных корней, вторичной гоморизии, плоской апикальной меристемы при облигатной розеточности) и поливариантности онтогенеза (наличие эфемерного варианта и варианта с зимовкой), продолжительности фаз жизненного цикла экологическому своеобразию вида: гигрофильности, минимальному размеру (минимальному числу метамеров на оси главного побега).

**Ключевые слова:** структура зародыша, коллет, ранний онтогенез, вторичная гоморизия, главный и придаточные корни

**DOI:** 10.31857/S0475145021040054

### ВВЕДЕНИЕ

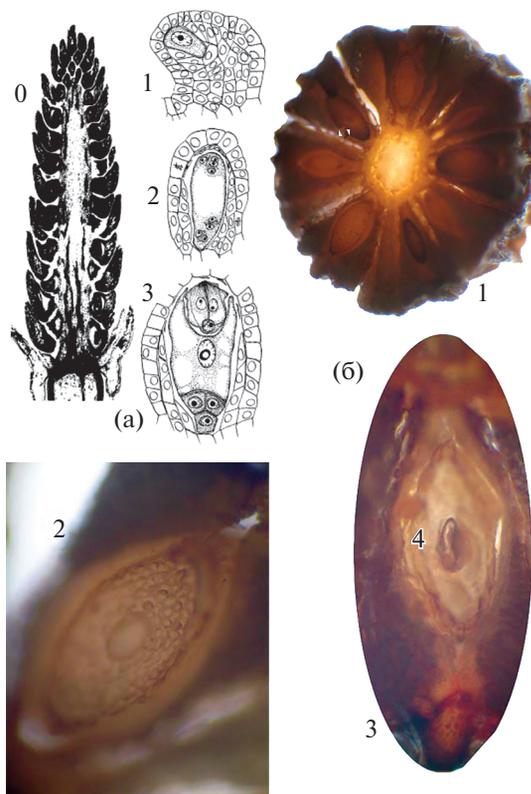
Объект нашего исследования — мышехвостник маленький *Myosurus minimus* L. в силу своего очевидного биоморфологического своеобразия не был обделен вниманием в ботанической литературе, хотя детального и тщательного изучения его онтогенеза, судя по всему, до сих пор не предпринималось. В тех же публикациях, которые затрагивали этот вид (Мусина и др., 1993; Нухимовский, 2020), не раз приводились либо неполные, либо ошибочные сведения. С учетом этого обстоятельства была подготовлена настоящая статья, претендующая на восполнение пробела в знаниях относительно названного объекта.

При этом, исходя из того, что доэмбриональному периоду и ранним стадиям эмбрионального периода онтогенеза мышехвостника в литературе было уделено больше внимания (Swingle, 1908; Buvat, 1989), в настоящей статье мы остановимся подробнее на более поздних стадиях эмбриогенеза и онтогенеза.

В обширном и многоликом семействе лютиковых Ranunculaceae, где представлено немало декоративных, ярких растений, есть удивительно мелкие и невзрачные виды. Иногда, как например, в названии мышехвостник маленький (*Myosurus minimus* L.), мелкие размеры подчеркивают-

ся автором вида (в данном случае Карлом Линнеем) даже в видовом эпитете. В определителе П.Ф. Мавевского (2014) для мышехвостника приведенные К.В. Киселевой приблизительные ориентировочные размеры (2–13 см), подчеркивают реальную мелкость, малую так называемую высоту (на деле длину главного побега) генеративных особей этого вида. Обработавший лютиковые для руководства “Сорные растения СССР” Н.В. Шипчинский (1934) приводит еще более узкую амплитуду изменчивости этого показателя — 2–8 см. Даже среди однолетних растений виды столь мелких размеров редки, и потому популяции таких видов заслуживают внимательного изучения в разных аспектах (Марков, 2020). Своих конечных размеров особи достигают в ходе онтогенеза, для которого очень характерна поливариантность, проявляющаяся в темпах роста, числе и структуре метамеров, образованных на разных этапах и зависящая от предпосылок, складывающихся в различных местообитаниях.

Малый размер особей, как морфологический признак, фигурирующий в описаниях таксонов, все равно очень приблизителен и может быть уточнен только при работе с реальными природными или модельными популяциями видов. Безусловно, даже более значимыми представляются данные по амплитуде изменчивости не только



**Рис. 1.** (а) — 0 — продольный микротомный срез многоорешка, справа (в соответствии с их размещением на цветоложе) показаны стадии развития зародышевых мешков в семязачатках, расположенных на разных уровнях многоорешка: 1 — оформленная археспориальная клетка; 2 — восьмиядерная стадия, 3 — зрелый зародышевый мешок, с яйцевым и антиподальным аппаратами и ядром центральной клетки, готовый к процессу оплодотворения. (б) — 1 — поперечный срез многоорешка; 2 — поперечный срез семени; 3 — продольный срез семени; 4 — зародыш в полости эндосперма.

высоты, но, даже в большей степени, воздушно-сухой массы особи, к примеру, данные о пороговом размере (массе), достаточном для ее перехода в репродуктивное состояние, но таких данных нет ни в одном определителе. Не приводятся они, зачастую, даже в статьях по биологии видов, например, из серии “Биологическая флора Московской области”, хотя подобная биологическая информация была бы явно очень полезной. Ведь размеры (биомасса) особи у однолетних растений напрямую определяет мощность их репродукции, то есть величину семенной продукции. Цель настоящей работы — показать ряд особенностей биоморфологии, анатомии и популяционной биологии мышехвостника, проявляющихся на разных, и, в том числе, самых ранних, стадиях онтогенеза.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал (гербарий и фиксации) был собран в 4-х природных популяциях мышехвостника в

Московской области. Особи, высушенные до воздушно-сухого состояния, были обработаны и взвешены на торсионных весах, а анатомию предварительно зафиксированных растений изучали на сделанных от руки или при помощи микротома срезах, обработанных флороглюцином и HCl, обеспечив возможность детального рассматривания всех одревесневших структур, включая стенки сосудов. Семена проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри в лаборатории. Появление проростков и формирование розеток и генеративных структур отслеживали как у особей, пересаженных в лабораторию, так и в природных популяциях. Все фотографии сделаны цифровой камерой Nikon Coolpix L22 с применением микроскопа и бинокулярной лупы или без дополнительного увеличения.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Протяженность многоорешка как продукта одного единственного цветка и его акропетальное нарастание как спороносного побега (стробила) приводит к тому, что апокарпные орешки разных уровней и семязачатки внутри них развиваются несинхронно и потому оказываются в момент наблюдения на разных стадиях формирования женского гаметофита, а позднее — зародыша. На рис. 1а, где приводится фото продольного среза многоорешка мышехвостника, и сопроводительных рисунках видно, что в верхней части он не закрыт, здесь продолжается рост — семязачатки, расположенные в самых верхних орешках, содержат еще лишь оформленные археспориальные клетки, тогда как семязачатки нижних орешков уже содержат зрелые зародышевые мешки. Процесс двойного оплодотворения и самых ранних стадий эмбриогенеза хорошо документирован в работе L.D. Swingle (1908), а более поздние стадии эмбриогенеза охарактеризованы и профессионально проиллюстрированы R. Vuvat (1989).

Формирующиеся орешки односеменные и содержат внутри очень мелкие семена. Отмечая, что мышехвостнику в целом присущ эмбриогенез *Onagrad (=Cruciferae)*-типа (Johansen, 1950), Э.С. Терехин (1996) уточняет, что базальная клетка, образованная в результате первого деления зиготы, не участвует или почти не участвует в построении тела зародыша. Краткую информацию о внутреннем строении семян находим в статье И.А. Ивановой (1966), сообщающей, что в каждом из них имеется обильный твердый эндосперм и маленький зародыш, лежащий на микропилярном конце семени и окруженный полуразрушенными лизированными клетками эндосперма. На приведенной в статье иллюстрации фигурирует лишь крайне схематичный рисунок орешка и еще более схематичное и мелкое изображение семени. Вместе с тем говорится, что, несмотря на малую



**Рис. 2.** Синаптокарпия – синхронное прорастание семян из плодиков многоорешка, упавшего на влажную почву.

абсолютную величину зародыша (0.2201 мм), он, составляя лишь 27.39% от длины эндосперма, довольно хорошо развит – имеет семядоли, центральный цилиндр в осевой части зародыша и корневой чехлик. Впрочем, перечисленные детали на представленном в статье рисунке не показаны. На рис. 16 приведены поперечный срез зрелого многоорешка, а также поперечный и продольный срезы семени. Можно видеть, насколько мелок зародыш, размещенный в полости богато липидами эндосперма, и констатировать сложность, если не невозможность различить какие-либо детали строения зародыша. Судя по нашим данным, такая картина и такие соотношения размеров наблюдаются относительно недолго, потому что при наличии подходящих условий (доступе влаги) рост зародыша, потребляющего питательные вещества эндосперма внутри семени продолжается. После созревания многоорешка, если он целиком, падая на почву, не попадает в условия пригодные для прорастания, когда может реализоваться синаптокарпия – синхронное прорастание семян всего многоорешка (рис. 2), он быстро высыхает, так что продолжение взаимодействия эндосперм–зародыш и транзит от первого ко второму питательных веществ, способствующих доразвитию зародыша, восстанавливается, по-видимому, только после набухания семени и прекращается непосредственно перед его прорастанием.

Отсюда понятно, почему к моменту прорастания, зародыш уже заполняет весь объем внутри семенной кожуры, а остатков эндосперма, которого к концу достижения апокарпными орешками их конечных размеров по объему было первоначально существенно больше (рис. 16), обнаружить уже не удается.

Прорастание же семени мышехвостника начинается, как и у большинства двудольных, с появ-

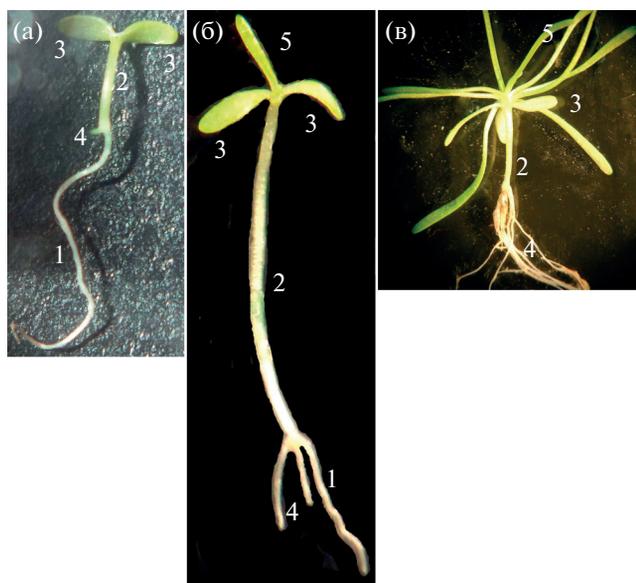


**Рис. 3.** Начальные этапы прорастания семени с появлением зародышевого корешка (1), hypocotилия (2) и коллета с ризоидами (3); (4) – семядоли пока в контакте с семенной кожурой.

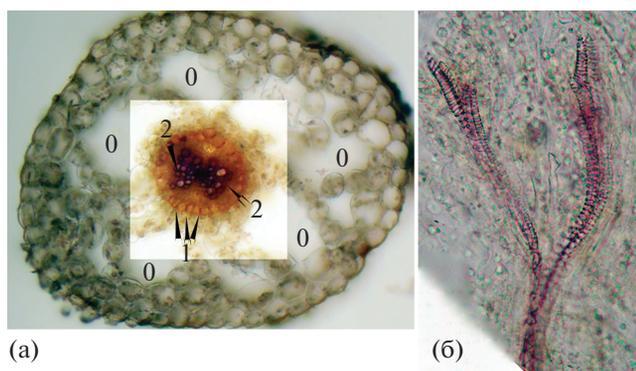
ления из семенной кожуры первичного корешка (radicle) и hypocotилия с коллетом (вздутием в области контакта hypocotилия с главным корнем (Compton, 1912; Юсуфова, Марков, 2014), покрытым ризоидами (рис. 3). В этот момент можно выдавить из кожуры увеличившийся в размерах зародыш и рассмотреть его структуру достаточно детально, что и было предпринято нами (см. рис. 4). Хорошо оформленные семядоли, между которы-



**Рис. 4.** Извлеченный из кожуры семени зародыш с семядолями (1), hypocotилием с просвечивающим центральным цилиндром (2) и корневым чехликом (3) (на давленном препарате).



**Рис. 5.** Начальные стадии формирования придаточных корней в нижней части гипокотыля проростка и ювенильных особей: зародышевый корешок (1); гипокотиль (2), семядоли (3) придаточные корни (4), настоящие листья розетки (5).



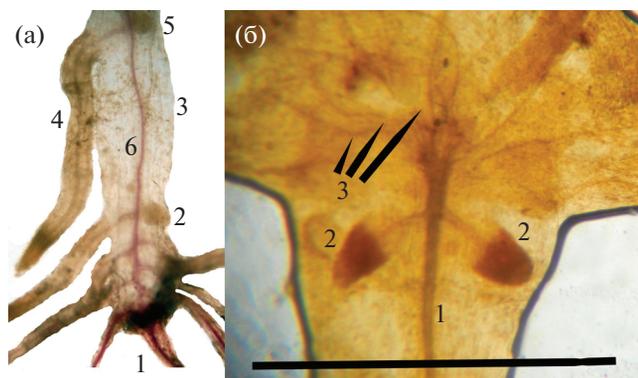
**Рис. 6.** (а) — слева — поперечный срез гипокотыля проростка с аэренхимой в коре (0), эндодермой с поясками Каспари (1) и двумя фрагментами вторичной ксилемы (2). (б) — снятые на просвет кольчато-спиральные сосуды ксилемы центрального цилиндра, дихотомирующего в семядоли.

ми заметна уплощенная плюмула, первичный корешок с корневым чехликом и явно выражен гипокотиль, в котором просвечивают ткани центрального цилиндра, — все это полностью, но уже в другом масштабе, соответствует выше приведенному, но, к сожалению, не иллюстрированному ею в деталях, описанию, данному И.А. Ивановой.

После прорастания, происходящего по надземному типу, уже у двусемядольного проростка заметно замедление и прекращение роста главного корня, но в зоне коллета очень рано закладыва-

ется первый придаточный корень (рис. 5а). На просвет в гипокотиле в результате происходящей внутренней дифференцировки становятся, благодаря прокрашиванию, видны проводящие ткани центрального цилиндра вплоть до деталей строения кольчатых и спиральных сосудов первичной ксилемы (рис. 6б), а также проводящие пучки ответвляющиеся от центрального цилиндра — по достижении семядольного узла — центральный цилиндр разделяется на два пучка, ответвляющихся в семядоли. На поперечных срезах гипокотыля проростка на этой достаточно ранней стадии можно видеть анатомическое строение, близкое к первичному диархному строению корня (рис. 6а). В аэренхиме первичной коры фигурируют крупные полости, а в хорошо выраженной эндодерме достаточно отчетливо видны пояски Каспари. Пока еще конутри от эндодермы видны два фрагмента вторичной ксилемы, что свидетельствует об уже произошедшем переходе ко вторичному утолщению.

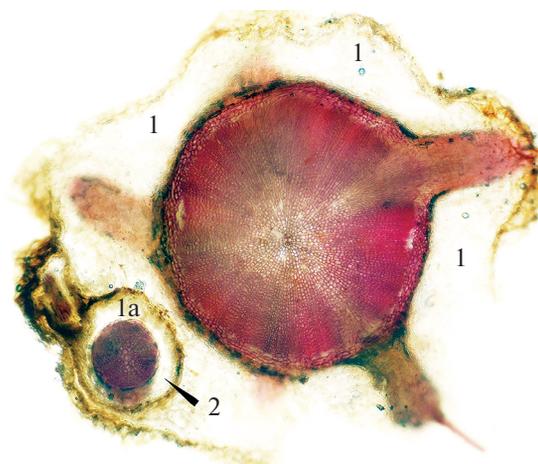
Выше упомянутый первый гипокотильный придаточный корень выступает как предвестник заложения серии придаточных корней, формирующих первую, особо важную для особей любых размеров, нижнюю гоморизную зону (рис. 7а). И центральный цилиндр гипокотыля и его ответвления переходят ко вторичному строению, а их вторичные одревесневающие проводящие ткани хорошо окрашиваются, что позволяет отчетливо увидеть кору как самого гипокотыля, так и кору его ответвлений. Вторичное утолщение с образованием крупного массива ксилемы продолжается и в гипокотиле, благодаря чему он сохраняется у особи на всю ее жизнь, и в придаточных корнях нижней зоны, каждый из которых имеет собственную кору с аэренхимой. Некоторые из них, отходя от центрального цилиндра, некоторое время гравитропно растут вертикально вниз под корой, прижимаясь к центральному цилиндру гипокотыля, что бывает хорошо видно на поперечных срезах (рис. 8). Наличие коры с хорошо выраженной аэренхимой у гипокотыля и его ветвей в нижней, гоморизной зоне представляется крайне интересной особенностью онтогенеза мышехвостника, которую вместе с наличием ризоидов на коллете, способствующих гравитропизму проростка и обеспечению его влагой еще до формирования настоящих корневых волосков (Parsons (2009, 2013), логично связать с гигрофильностью, свойственной этому виду и способностью произрастать в местообитаниях не только с недостатком, но, порой, и с избыточным увлажнением. Посевы культурных растений, подвергшиеся вымоканию, — это пример подобных местообитаний, в которых популяции мышехвостника находят оптимальные условия и могут иметь наиболее высокую плотность (рис. 9).



**Рис. 7.** (а) — снятый на просвет гипокотиль (3) с нижней и верхней гоморизными зонами ювенильного растения мышехвостника: зародышевый корешок (1), зачаток придаточного корня и сформированные придаточные корни нижней гоморизной зоны (2); зачаток (5) и сформированный придаточный корень (4) верхней гоморизной зоны; просвечивающий центральный цилиндр гипокотыля (6) с ответвлениями в придаточные корни нижней гоморизной зоны; (б) — просвечивающий центральный цилиндр гипокотыля (1); зачатки придаточных корней верхней гоморизной зоны с чехликами (2) и проводящие пучки, ответвляющиеся в розеточные листья от центрального цилиндра (3). Масштабная линейка 3 мм.

Вторая (верхняя) гоморизная зона формируется только у достаточно мощных особей в верхней части гипокотыля вблизи розетки, причем не всегда придаточные корни отходят здесь от узлов главного побега. На рис. 7 показана полностью развитая нижняя зона придаточных корней, включая их хорошо оформленные зачатки, а также верхняя зона придаточных корней вблизи розетки с уже сформированным придаточным корнем и также хорошим оформлением зачатков, имеющих даже сформированные внутри гипокотыля корневые чехлики (рис. 7б). Между этими двумя (нижней и верхней) зонами находится зона бескорневого гипокотыля — вероятность заложения здесь придаточных корней крайне низкая, что позволяет рассматривать ее по аналогии с известной зоной торможения побега, где почки не активны.

Любопытной особенностью мышехвостника, как облигатно розеточного растения, представляется наличие увенчивающего гипокотыля плоского или иногда даже несколько вогнутого апекса, который, подобно плоскому апексу подорожника большого (*Plantago major*), также никогда не теряющего своей розеточности, формирует в норме большую и плотную розетку листьев. Располагающиеся по периферии вокруг медуллярной центральной части плоской апикальной меристемы (т.н. меристемы ожидания — Vuvat, 1989) листовые примордии в составе так называемого инициального кольца (Vuvat, 1989), превращаются позднее в узкие листья с одной (у ювенильных особей)

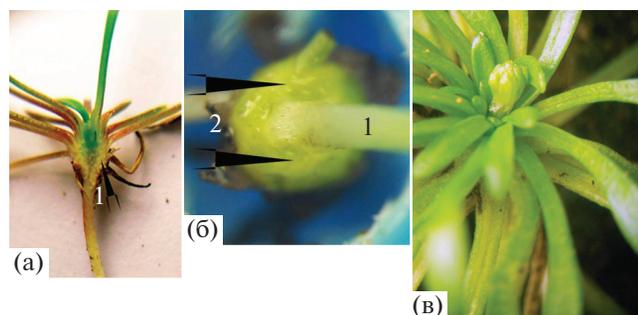


**Рис. 8.** Поперечный срез нижней части гипокотыля взрослой генеративной особи с корой (1), придаточными корнями и отходящими от центрального цилиндра проводящими пучками, следующими в эти корни. Поперечный срез одного из придаточных корней (2) с его собственной корой (1а), гравитропно направившегося вниз под корой гипокотыля.

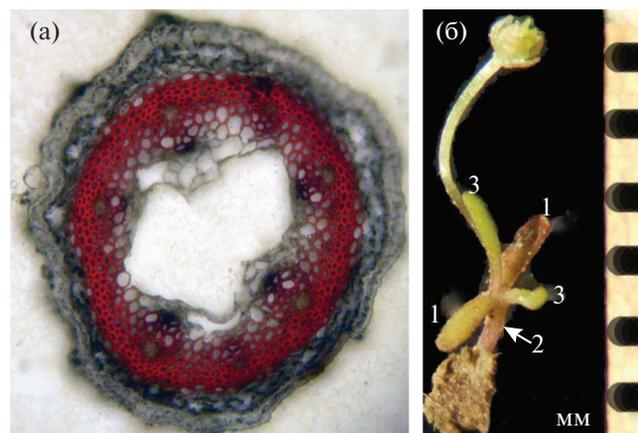


**Рис. 9.** Фрагмент популяции мышехвостника на краю посева, перенесшего вымокание.

или тремя (у генеративных особей) жилками. Основания розеточных листьев остаются после отпадения пластинок, охватывая ось укороченного розеточного побега (рис. 10а). После удаления развитых розеточных листьев становится хорошо заметно, что диаметр розеточной части главной оси заметно больше, чем диаметр цветоноса, т.е. репродуктивной части главной оси (рис. 10б). Для анатомии поперечного среза цветоножки характерно наличие склеренхимы перицикла, расположенных по кругу коллатеральных проводящих пучков и полую сердцевину (рис. 11а). В отличие от апикальной меристемы подорожника, обеспечивающей моноподиальное нарастание главной оси при фор-



**Рис. 10.** (а) – укороченная и разросшаяся по диаметру ось розетки, покрытая основаниями розеточных листьев; (б) – цветонос первого цветка, завершающего рост главной оси розетки (1) инициальное кольцо листовых примордиев плоской апикальной меристемы, сформировавшей до этого розетку (2), (v) – первый цветок, увенчивающий главную ось розетки.



**Рис. 11.** (а) – поперечный срез цветоноса первого цветка; (б) – цветонос особи минимального размера с живыми семядолями (1), гипокотилем (2) и двумя первыми настоящими розеточными листьями (3).



**Рис. 12.** Особи осенней когорты 20 октября 2015 г.; масштабная линейка – 1.5 см.

мировании только пазушных репродуктивных побегов, меристема мышехвостника изменяет свою форму при переходе особи из вегетативного в генеративное состояние и формирует верхушечный цветок (рис. 10в). Размеры этого цветка (по длине образующегося в нем многоорешка) у нормально развитых особей мало отличаются от цветков, впоследствии формирующихся на паракладиях в пазухах нижерасположенных розеточных листьев. Из сказанного ясно, что при отсутствии выраженной гетерофиллии у мышехвостника различать онтогенетические (~возрастные) состояния удается только по анатомии листьев (числу жилок), а по форме листьев различия между ними очень слабо выражены и потому плохо заметны.

Итак, гипокотиль мышехвостника вместе с придаточными корнями, благодаря переходу ко вторичному росту, сохраняется в течение всей жизни особи, и в этом наиболее существенная особенность, отличающая мышехвостник от большинства травянистых двудольных, гипокотиль у которых очень быстро сдавливается, съезживается и потому становится у взрослой особи незаметным. По понятным причинам такую судьбу гипокотиля разделяет и еще более эфемерный атрибут гипокотиля коллет.

Поэтому весьма странным выглядит утверждение авторов атласа по анатомии растений (Schweingruber et al., 2011: 7), что для анатомических исследований и определения возраста наиболее важной частью растения является переходная зона между корнем и стеблем (которую авторы называют “collar”). Но термины “collar” и “collet” (коллар и коллет) – это синонимы для обозначения соответствующей морфологической структуры, которой присуща определенная важная функция, а не просто зоны между двумя другими структурами (Compton, 1912; Parsons, 2009; Юсуfoва, Марков, 2014).

Вопреки неоднократно опубликованному мнению, что мышехвостник – это весенний эфемер, следует уточнить, что в условиях нашего умеренного климата, демонстрируя поливариантность онтогенеза, он ведет себя, не только как весенний эфемер, но и как зимующий или озимый однолетник. Во втором случае прорастание семян и формирование розеток у него наблюдается в конце лета или осенью (рис. 12), и от того, в каком состоянии особи такой осенней когорты уходят в зиму, зависит их реализуемая весной репродуктивная мощность, поскольку вегетативный рост, начавшийся осенью, весной не продолжается. Так в мае 2015 г. из-за позднего прорастания осенью предыдущего года, особи мышехвостника были очень мелкими и на стадии репродукции имели размеры близкие к минимальным (рис. 11б). Но и такие особи способны формировать 5–7 вполне



**Рис. 13.** Мощная генеративная особь мышехвостника с гипокотилем и придаточными корнями. Внизу — паракладий — боковой побег с кроющим листом, из пазухи которого он появился (1), двумя розеточными листьями (2) и многоорешком (3).

жизнеспособных семян, что было доказано в наших опытах по проращиванию.

Как показано выше, розетку мышехвостника (облигатно розеточного однолетника) формирует плоский апекс с окружающим его инициальным кольцом листовых примордиев (рис. 10б). Минимальное число фитомеров взрослого типа в составе розетки, достаточное для перехода к репродукции, — всего 2 (рис. 11б). Редко у кого из растений, даже однолетних, можно наблюдать такое малое число фитомеров, образуемых в ходе онтогенеза на главной оси, а воздушно-сухая масса минимальных по размеру особей может составлять иногда менее 1 мг! У крупных особей на основе плотной главной розетки из большого числа листьев и мелких розеток из двух листьев у каждого из паракладиев (рис. 13) формируется высокая семенная продуктивность — до 1500 орешков на особь.

Ранее нами уже было показано, что в популяциях именно самые мелкие одноцветковые особи в сумме формируют число орешков превышающее то, которое образуют особи других размерных классов (Марков, 1992, 2020). При этом для особей всех размерных классов характерно весьма высокое и сходное репродуктивное усилие (до 80%!), а коэффициенты в популяционно-алло-

метрических уравнениях близки к единице — указывая на изометрию — сохранение сходных пропорций у особей разной мощности.

## ВЫВОДЫ

1. К моменту их прорастания в семенах мышехвостника нет эндосперма и присутствует только занимающий весь объем краекорешковый зародыш с первичным корешком (*radicle*), который первым трогается в рост при прорастании, семядолями и уплощенной плюмулой между ними.

Вопреки имеющимся в литературе сведениям о преобладающем в семени по объему эндосперме и крохотном зародыше установить, когда зародыш сумел настолько вырасти, что присутствие эндосперма в семени к моменту прорастания практически незаметно, довольно трудно.

2. Мышехвостник маленький *Myosurus minimus* L., не имея системы стержневого корня, который отмирает на самых ранних стадиях (стадии первичного корешка) — вскоре после прорастания семени, формирует в ходе онтогенеза систему придаточных корней, которая начинает формироваться уже на стадии 5-дневного проростка с образования первого придаточного корня на гипокотиле; продолжение формирования этой системы идет по четко выраженному плану: после формирования серии придаточных корней вблизи нижнего конца гипокотиля центр формирования новой серии многочисленных придаточных корней смещается вверх сразу к нижней части розетки, так что между названными двумя очагами формирования придаточных корней остается лишенная корней средняя и наиболее протяженная зона — некая “зона торможения”.

3. Гипокотильные придаточные корни отходят от центрального тяжа проводящих тканей вместе с имеющейся у них корой и сразу приобретают характерную для корней гравитропическую направленность роста.

4. Гипокотиль мышехвостника претерпевает вторичное утолщение и потому сохраняется у особи на всю ее жизнь. Проводящая система гипокотиля начинает формироваться очень рано и при условии окрашивания ее одревесневших элементов флороглюцином видна уже у зародыша, выведенного из кожур. Чуть позднее можно рассмотреть кольчатые и спиральные сосуды, тяжи которых дихотомически расходятся к семядолям. В коре гипокотиля есть хорошо оформленная аэренхима, что объясняет приуроченность растения к местообитаниям не только с достаточной, но и избыточно высокой влажностью почвы.

5. Дополнительной деталью, свидетельствующей о гигрофильности мышехвостника можно считать коллет, покрытый ризоидами.

6. Для мышехвостника маленького характерна поливариантность онтогенеза и наличие, помимо весеннего эфемерного варианта, варианта зимующего однолетника с перезимовкой розеток и обязательным немедленным переходом к репродукции сразу после зимовки.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит Т.В. Архипову и Л.Ш. Граханцеву за помощь в сборе материала.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках программы исследований Популяционно-онтогенетического и биоморфологического направления, запланированных на кафедре ботаники Московского педагогического государственного университета. Какой-либо целевой финансовой поддержки автор статьи не получал.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова И.А. О внутреннем строении семян лютиковых // Бюл. ГБС. 1966. Вып. 61. С. 72–79.
- Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. М.: Т-во науч. изд. КМК. 2014. 635 с.
- Марков М.В. Роль многоорешков в обеспечении пластичности репродуктивной сферы у *Ceratocephala*

- falcata* (L.) Pers и *Myosurus minimus* L. // Бюл. МОИП, отд. Биология. 1992. Т. 97. Вып. 1. С. 51–67.
- Марков М.В. Популяционная биология растений. М.: КМК, 2012. 387 с.
- Марков М.В. “Изюминка” популяционной биологии малолетних растений или почему размеры растений также важны // Журн. Общей Биологии. 2020, Т. 81. № 6. С. 458–468.
- Мусина Г.В., Барыкина Р.П., Чубатова Н.В. *Myosurus minimus* L. // Биологическая флора Московской области. 1993. Вып. 9(1). С. 65–73.
- Нухимовский Е.Л. Основы биоморфологии семенных растений. Том 3: Теория интегральной соматической эволюции. М.: Недра. 2020. 676 с.
- Терехин Э.С. Семя и семенное размножение. Мир и семя-95. СПб., 1996. 376 с.
- Шипчинский Н.В. *Myosurus* L. Мышехвостник // Сорные растения СССР. Л.: АН СССР, 1934. Т. 2. С. 228–229.
- Юсуфова В.З., Марков М.В. К анатомии и морфологии коллета как особой структуры у проростков некоторых видов растений // Труды IX международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти И.Г. и Т.И. Серебряковых. (К 100-летию со дня рождения И.Г. Серебрякова). М., 2014. Т. 2. С. 306–309.
- Compton R.H. Theories of anatomical transition from root to stem // New Phytol. 1912. V. 1. P. 13–25.
- Johansen D.A. Plant Embryology. N.Y., The Chronica Botanica Company. 1950. 305 p.
- Parsons R.F. Hypocotyl hairs: an historical perspective // Aust. J. Bot. 2009. 57:106–108.
- Parsons R.F. Adaptations to floodplains in *Populus* and *Salix*: the role of collet hairs // Trees. 2013. V. 27. P. 1–5.
- Salisbury E.J. The pioneer vegetation of exposed muds and its biological features // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1970. V. 259. P. 207–255. <https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0059>
- Schweingruber F.H., Börner A., Schulze E.-D. Atlas of Stem Anatomy in Herbs, Shrubs and Trees. Springer. 2011. V. 1. 490 p.
- Swingle L.D. Embryology of *Myosurus minimus* // The American Naturalist. 1908. V. 42. № 501. P. 582–591.

## Biomorphological and Anatomical Features Manifested in the Course of Development (Ontogenesis) in the Mousetail *Myosurus minimus* L. (Ranunculaceae)

M. V. Markov\*

Moscow Pedagogical State University, ul. Malaya Pirogovskaya 1, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: markovsmail@gmail.com

The unique features of the embryo development, morphological and anatomical shoot structure and root system in one of the smallest annual plants mousetail at earliest and following stages of ontogenesis are shown. The correspondence of revealed structures (presence of collet with rhizoids, aerenchyma in the primary cortex of the hypocotyl and adventive roots, secondary, homorhizia, plane apical meristem together with obligate rosette structure of the main shoot) and of polyvariant ontogenesis (spring ephemeral variant and variant with overwintering), longevity of life circle phases to the ecological features of species: hygrophily, minimal threshold size (minimal number of metamers of the main shoot axis).

**Keywords:** seed embryo structure, collet, early ontogenesis, secondary homorhizia, main root (radicle), adventive roots

## ВОЛЬВОКС КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГИБЕЛИ КЛЕТОК И СТАРЕНИЯ

© 2021 г. А. Г. Десницкий\*, \*\*

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии,  
Университетская набережная, 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: adesnitskiy@mail.ru

\*\*e-mail: a.desnitsky@spbu.ru

Поступила в редакцию 05.11.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 06.01.2021 г.

Сферическая зеленая водоросль вольвокс состоит из нескольких сотен или тысяч соматических клеток, которые претерпевают терминальную дифференцировку, старение и смерть, и небольшого числа гонидий (бесполох репродуктивных клеток), которые дают начало особям следующего поколения. В первой части настоящей статьи кратко рассмотрены онтогенетическое разнообразие рода *Volvox*, а также механизмы дифференцировки на два упомянутых выше типа клеток, которые были обстоятельно исследованы в последние годы у *Volvox carteri*. Затем проведен подробный критический анализ литературных и некоторых собственных данных по старению и гибели клеток (в основном у *V. carteri* и в меньшей степени у *V. aureus*) и отмечено, что этот аспект биологии развития вольвокса изучен недостаточно. Указаны некоторые перспективы дальнейшего исследования процессов гибели клеток и старения у представителей рода *Volvox* в сравнительном аспекте.

**Ключевые слова:** гибель клеток, дифференцировка клеток, клеточные деления, старение, циклы развития, *Volvox*

**DOI:** 10.31857/S0475145021030034

### ВВЕДЕНИЕ

Процессы старения и гибели клеток изучаются в последние годы на разнообразных объектах и модельных системах: многоклеточных животных (Goldsmith, 2015; Brusentsev et al., 2017; Davaapil et al., 2017; Skulachev, Skulachev, 2017; Zhu et al., 2019 и др.), высших растений (van Doorn, Woltering, 2004; Rogers, 2015; Locato, De Gara, 2018; Woo et al., 2019; Doronina et al., 2020 и др.), одноклеточных организмах, включая протистов (Gordeeva et al., 2004; Franklin et al., 2006; Deponte, 2008; Kasuba et al., 2015; Bidle, 2016; Durand et al., 2016). Среди модельных организмов (систем) для анализа этой проблемы достаточно важное место могли бы занимать одни из самых примитивных многоклеточных (колониальных) организмов – вольвоксовые водоросли, на что в литературе традиционно обращали внимание (см., например: Weismann, 1893, 1904; Golstein et al., 2003; Bhatia-Dey et al., 2016). Тем не менее, первые экспериментальные исследования старения водоросли *Volvox* (Chlorophyta, Volvocales, Volvocaceae) были опубликованы около 40 лет тому назад (Hagen, Kochert, 1980; Pommerville, Kochert, 1981, 1982), последующие работы по упомянутой теме появлялись лишь эпи-

зодически и не было специальных обобщающих публикаций о гибели клеток и старении у этого типичного представителя фитопланктона стоячих пресных вод. В настоящей статье вначале кратко изложены некоторые современные данные по биологии развития *Volvox* (важные для понимания основной темы обзора), а затем представлено обсуждение данных литературы и некоторых собственных данных по гибели клеток и старению у вольвокса, что расширит представления об особенностях этих процессов у низших растений.

Говоря о старении и клеточной гибели у вольвокса, как правило, имеют в виду возрастные изменения соматических клеток в ходе развития модельного вида *V. carteri*. В этой статье впервые в литературе по старению *Volvox* предпринята попытка применить сравнительный подход и привлечь данные по “немодельному” виду *V. aureus*. Наконец, хотелось также привлечь внимание к особенностям гибели гонидий (потенциально бес- смертных бесполох репродуктивных клеток) при ограничении ресурсов в стареющих культурах у разных видов вольвокса.



**Рис. 1.** Молодые бесполое колонии (сфероиды) *Volvox carteri* f. *weismannia* незадолго до освобождения из родительского сфероиды, соматические клетки которого скоро вступят в фазу старения.

#### ОСНОВНЫЕ ДАННЫЕ О РАЗВИТИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК У *VOLVOX*

Род *Volvox* включает более 20 видов (Herron, Nedelcu, 2015; Nozaki et al., 2015, 2019, 2020) и эти зеленые жгутиковые водоросли предоставляют возможность анализировать индивидуальное развитие в системе, состоящей лишь из двух клеточных типов — нескольких сотен или тысяч маленьких соматических клеток и небольшого числа (обычно 8–16) крупных репродуктивных клеток. Несмотря на относительную простоту организации вольвокса (рис. 1), исследователи сталкиваются здесь с целым рядом интересных явлений и процессов: формированием клеточных линий, ростом и дроблением репродуктивных клеток, перестройками онтогенеза в эволюции родственных видов, морфогенезом, половыми феромонами и т.д. Таким образом, вольвокс стал весьма популярным модельным объектом биологии развития — упомянутым выше аспектам онтогенеза этой водоросли посвящен ряд обзорных статей последних лет (Herron, 2016; Matt, Umen, 2016; Desnitskiy, 2018, 2019; Desnitskiy et al., 2018; Umen, 2020 и др.).

Цикл бесполого развития *Volvox*, который изучают в условиях клональных аксенийных (содержащих микроорганизмы только одного вида) культур, включает рост гонидий, период их дробления (серия 9–15 синхронных делений у различных видов), инверсию (выворачивание наизнанку) моло-

дых сфероидов, их рост внутри родительской особи, освобождение из родительского сфероиды, после чего происходят рост и дробление гонидий следующей генерации. С другой стороны, остающийся сферический “каркас” (hulk), состоящий только из родительской сомы, стареет и умирает. Традиционно различали два основных типа бесполого развития и размножения у *Volvox* (Starr, 1970; Kochert, 1975; Desnitskiy, 1992, 1995; Desnitskiy, 2016). Можно говорить также о наличии двух репродуктивных стратегий. У нескольких видов (*V. africanus*, *V. carteri* f. *kawasakiensis*, *V. carteri* f. *nagariensis*, *V. carteri* f. *weismannia*, *V. gigas*, *V. spermatosphaera*), гонидии в результате продолжительного периода свето-зависимого роста до начала дробления достигают крупных размеров и превышают соматические клетки по диаметру по крайней мере в 6–8 раз; во время быстрых последовательных делений (весь период дробления занимает не более 10–12 часов), которые могут происходить в темноте, нет клеточного роста. Напротив, у других видов (например, *V. aureus*, *V. ferrisii*, *V. globator*, *V. rousseletii*), зрелые гонидии относительно небольшого размера и превышают соматические клетки по диаметру не более, чем в 3–4 раза, поскольку период роста гонидий короткий и клетки зародыша растут в длительных интервалах между делениями дробления, требующего света. Следовательно, в данном случае период дробления растянут по крайней мере на двое или трое суток. Деления начинаются утром первого дня, временно блокируются ночью, возобновляются утром следующего дня, снова останавливаются ночью и т.д. (Desnitskiy, 2017). Филогенетический анализ (Herron et al., 2010) показывает, что такой тип бесполого развития вольвокса (с медленным светозависимым дроблением) является эволюционно продвинутым.

Циклы полового онтогенеза вольвокса включают развитие и дифференцировку сфероидов с мужскими или женскими репродуктивными клетками (вместо бесполой гонидий). Единственной диплоидной стадией в жизненном цикле *Volvox* является зигота (зигоспора), которая прорастает после периода покоя (Starr, 1975). У большинства представителей рода *Volvox* выявлены видо-специфичные половые феромоны (Starr, 1970; Kirk, 1998; Hallmann, 2011; Coleman, 2012). В частности, у *V. carteri* f. *nagariensis* под влиянием такого феромона, производимого спонтанно образовавшейся мужской особью или соматическими клетками бесполой особи, находящейся в стрессовых условиях (например, тепловой шок или механическая травма), гонидии бесполой особи подвергаются модифицированному паттерну дробления и формируют в следующем поколении половые особи (с яйцеклетками в женском клоне или с андрогонидиями в мужском клоне).

Возвращаясь к краткому описанию бесполого цикла развития перейдем к проблеме дифференцировки на типы репродуктивных и соматических клеток. Прежде всего заметим, что наличие в сфероиде вольвокса соматических клеток – это несомненный признак многоклеточного организма. При этом отличительной особенностью и достоинством данного объекта (по сравнению, например, с многоклеточными животными или высшими растениями) является то, что сома у вольвокса представлена всего лишь одним типом клеток. Согласно филогенетическому анализу (Herron, Michod, 2008) сома возникла три раза в ходе эволюции водорослей порядка Volvocales, причем дважды в пределах полифилетического рода *Volvox*. Основными функциями двужгутиковых соматических клеток вольвокса являются обеспечение подвижности организма (включая фототаксис), а также синтез гликопротеинового межклеточного матрикса, объединяющего в составе сфероида клетки обоих типов (Matt, Umen, 2018). Предполагали (Koufopanou, Bell, 1993; Koufopanou, 1994; Hoops et al., 2006) возможность передачи от молодых соматических клеток питательных веществ (синтезированных ими либо даже “подхваченных” из окружающей среды) к гонидиям и дробящимся зародышам, хотя до сих пор это окончательно не доказано.

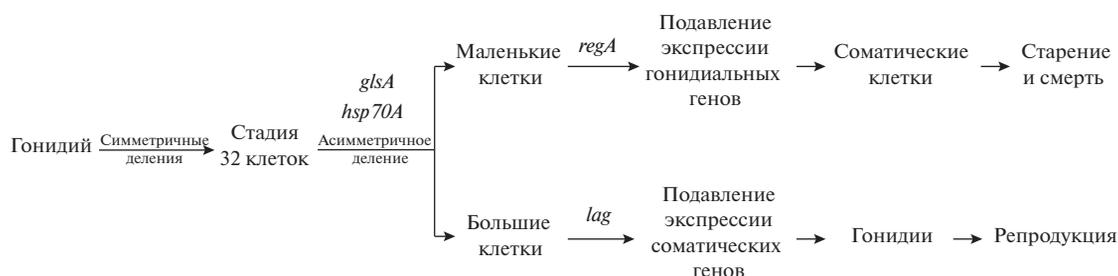
Зародыши *V. africanus*, *V. carteri* f. *kawasakiensis*, *V. carteri* f. *nagariensis*, *V. carteri* f. *weismannia*, *V. obversus*, и *V. reticuliferus* характеризуются асимметричными (неравными) делениями и дифференциацией линий презумптивных репродуктивных и соматических клеток на относительно ранних этапах развития, на 16-клеточной, 32-клеточной либо на несколько более поздних стадиях дробления (Starr, 1969; Karn et al., 1974; Nozaki, 1988; Herron et al., 2010; Desnitskiy, 2016). У зародышей других видов вольвокса асимметричных делений нет и гонидии становятся морфологически отличимыми от соматических клеток только после завершения дробления или даже после инверсии молодого сфероида.

Теперь перейдем к краткому изложению данных по клеточным и молекулярно-генетическим механизмам дифференцировки на сому и гонидии у *V. carteri* f. *nagariensis*, единственному представителю рода, подробно изученному в этом отношении (Tam, Kirk, 1991; Kirk, 1998, 2001, 2005; Pappas, Miller, 2009; Matt, Umen, 2016 и др.). Когда зародыш этого вида и формы *Volvox* достигает 32-клеточной стадии дробления (после пяти симметричных делений), 16 передних клеток делятся асимметрично на большие и маленькие клетки, соответственно линии презумптивных гонидиальных и соматических клеток следующей генерации. Напротив, 16 клеток в задней части зародыша претерпевают только симметричные деления и таким образом вносят вклад только в формирование

линии маленьких соматических клеток. Асимметричные деления в передних клетках зародыша происходят под контролем генов *glsA* и *Hsp70A*, которые кодируют белки шапероны (соответственно *glsA* и *Hsp70A*) взаимодействующие с митотическим веретеном и смещающие плоскость клеточного деления (Kirk et al., 1999; Cheng et al., 2005; Pappas, Miller, 2009). Интересно, что имеется несколько работ, показавших вовлечение гена *glsA* также в мужской гаметогенез (Mori et al., 2003; Igawa et al., 2009) у лилиецветных (Liliales) либо в другие морфогенетические процессы у высших растений (Guzman-Lopez et al., 2016).

В ходе развития зародыша *V. carteri* f. *nagariensis* после асимметричного деления дробления продукты гена *lag* подавляют активность соматических генов в больших клетках, тогда как в маленьких клетках продукты гена *regA* подавляют активность гонидиальных генов (Kirk, 2001; Matt, Umen, 2016). Следовательно, большие и маленькие клетки зародыша дифференцируются соответственно в большие репродуктивные клетки (бесполье гонидии) и маленькие соматические клетки. Предыдущие экспериментальные исследования (Pall, 1975; Kirk et al., 1993) показали, что все клетки зародыша, достигающие в конце серии делений 8 мкм в диаметре или более, становятся гонидиями (независимо от их положения в сфероиде), а все клетки менее 8 мкм в диаметре дифференцируются как соматические. Заметим, что в ходе нормального развития у *V. carteri* f. *nagariensis* формирующиеся гонидии в конце серии делений имеют размер около 13 мкм в диаметре, а молодые соматические клетки – около 2 мкм. Таким образом, важным фактором, определяющим направление дифференцировки клеток молодого сфероида этого вида вольвокса, является их размер. Однако причина прямой связи между размером эмбриональной клетки и определением ее судьбы остается загадочной. Формальная схема процесса дифференциации на гонидии и соматические клетки у *V. carteri* f. *nagariensis* представлена на рис. 2.

Из всех упомянутых выше генов *V. carteri* f. *nagariensis* наиболее подробно изучен ген *regA*, контролирующий соматическую дифференцировку, препятствующий биогенезу хлоропластов и кодирующий локализующийся в ядре репрессор транскрипции (Tam et al., 1991; Choi et al., 1996; Kirk et al., 1999; Stark et al., 2001; Duncan et al., 2007; Grochau-Wright et al., 2017 и др.). В свете этих данных становится понятно, почему содержание хлоропластной ДНК в гонидии перед началом периода дробления превышает содержание хлоропластной ДНК в соматической клетке примерно в 120 раз (Kochert, 1975). Интересно отметить, что в мутантных линиях *regA*<sup>-</sup> сначала формируются морфологически нормальные молодые бесполье сфероиды с обоими клеточными типами. Однако затем соматические клетки увеличи-



**Рис. 2.** Схематичное изображение процесса дифференцировки на соматические и репродуктивные клетки в ходе бесполого цикла развития у *Volvox carteri*. Показано, на каких этапах онтогенеза активны гены *glsA*, *hsp70A*, *regA* и *lag* (по: Kirk, 2001, 2005; Matt, Umen, 2016, с упрощениями).

ваются в размерах, трансдифференцируются в гонидии и претерпевают серию делений дробления. Эта группа мутаций у *V. carteri* f. *nagariensis* была впервые описана около 50 лет назад и была тогда названа “somatic regenerator” (Starr, 1970).

Интересно, что Э. Ханшен и соавторы (Nanschen et al., 2014) недавно идентифицировали ген *regA* также и у нескольких других представителей полифилетического рода *Volvox*, в том числе у *V. ferrisii*, вида с маленьким размером зрелых гонидий и без асимметричного деления. Последний общий предок *V. carteri* f. *nagariensis* и *V. ferrisii* не имел соматических клеток (Herron, Michod, 2008) и, таким образом, в двух эволюционных линиях сома возникла независимо. Ген *regA*, критически важный для соматической дифференцировки у *V. carteri* f. *nagariensis*, имеет гомолога у одноклеточной родственной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* из порядка Volvocales. У *C. reinhardtii* этот гомологичный ген экспрессируется в стрессовых условиях, когда клеточный рост и размножение подавлены (Nedelcu, Michod, 2006; Nedelcu, 2009a; König, Nedelcu, 2020). С другой стороны, ген *lag*, важный для дифференцировки гонидий у *V. carteri* f. *nagariensis*, еще не был предметом тщательного изучения (в отличие от генов *regA*, *glsA* и *Hsp70A*) и сравнительно недавно было отмечено (Matt, Umen, 2016), что конкретный механизм действия этого гена в дифференцировке на два клеточных типа пока неясен.

### СТАРЕНИЕ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК У ВОЛЬВОКСА

Соматические клетки вольвокса являются терминально дифференцированными пост-митотическими клетками, претерпевающими старение и смерть (Starr, 1970; Kochert, 1975; Kirk, 1998; Matt, Umen, 2016 и др.). Они не способны делиться после завершения процессов дробления и инверсии зародыша. Имеющееся в литературе описание деления соматической клетки у *V. aureus* (Soyer, 1973, Plate 3, Fig. 2) не заслуживает доверия и представляется чрезвычайно сомнительным. Впрочем,

нельзя полностью исключить возможность терминологической путаницы в упомянутой статье, автор которой не указала на каких этапах жизненного цикла вольвокса брала материал для исследования. Клетки дробящегося зародыша (еще не дифференцированного на два клеточных типа) в этой публикации могли бы быть ошибочно названы соматическими.

Первая серия экспериментальных работ по старению соматических клеток у вольвокса была выполнена на частично синхронизированных культурах *V. carteri* f. *nagariensis* (Hagen, Kochert, 1980) и *V. carteri* f. *weismannia* (Pommerville, Kochert, 1981, 1982) при температуре 28–30°C, свето-темновых режимах 39 ч : 9 ч или 29 ч : 19 ч и пересевах на свежую питательную среду каждые два дня (за эти 48 ч завершался один цикл бесполого развития). У этих форм вольвокса соматические клетки от момента своего формирования до этапов терминальной дифференцировки и старения в большинстве случаев увеличиваются в диаметре от примерно 2 до 5–6 мкм. В упомянутых исследованиях лаборатории Г. Кохерта были показаны существенные различия в паттернах мечения полипептидов (по включению <sup>35</sup>S) между молодыми соматическими клетками и гонидиями, а также между молодыми и стареющими соматическими клетками. Эти данные говорили о перспективности использования *V. carteri* как модельного объекта для изучения процесса старения сомы. Уместно отметить, что ранее в той же лаборатории был разработан метод разделения на два клеточных типа в культурах вольвокса для последующего биохимического анализа (Yates et al., 1975).

Соматические клетки молодых растущих сфероидов (после их освобождения из родительской особи) характеризуются интенсивной работой жгутиков и активно синтезируют внеклеточный гликопротеиновый матрикс. На этом этапе развития белковый синтез в относительно молодых соматических клетках протекает примерно в пять раз интенсивнее, чем в стареющем каркасе родительской сомы, внутри которого уже нет особей молодого поколения и который мало подвижен вследствие

резкого ослабления интенсивности работы жгутиков (Hagen, Kochert, 1980; Pommerville, Kochert, 1982). Однако даже на этом завершающем этапе бесполого жизненного цикла соматические клетки сохраняют способность к регенерации жгутиков, которая осуществляется за два часа (дефлагелляцию на обеих стадиях развития производили путем резкого понижения pH от 8.0 до 4.0 в течение 90 с) (Coggin, Kochert, 1986). Сопоставление особенностей соматических клеток на разных этапах цикла бесполого развития показывает, что в процессе старения на фоне уменьшения содержания в клетках белков и уменьшения числа цитоплазматических рибосом, происходит также интенсивная аккумуляция цитоплазматических липидных телец, замедление фотосинтетической активности и затем ее утрата, нарушение структуры хлоропласта, уменьшение содержания хлорофилла, в результате чего зеленая пигментация клеток ослабевает и в конце концов исчезает (Hagen, Kochert, 1980; Pommerville, Kochert, 1981, 1982). Эти возрастные изменения сомы у вольвокса постепенные и кумулятивные; они напоминают процессы, происходящие, например, при старении листьев у высших растений (Guo, Gan, 2005).

К сожалению, четкая хронологическая последовательность развития сомы, а также однозначные определения молодых, зрелых и переходящих к старению соматических клеток отсутствуют в рассмотренных работах лаборатории Кохерта. Тем не менее, было показано, что у *V. carteri f. nagariensis* соматические клетки начинают стареть и умирают значительно раньше, чем у *V. carteri f. weismannia* (время жизни соматических клеток после их исходного формирования при развитии сфероидов составляет соответственно около 4 и 5–7 сут) (Pommerville, Kochert, 1982). Авторы не объяснили причину таких различий по темпам старения. Как бы то ни было, данные пионерских исследований Кохерта говорили в пользу того, что прохождение соматических клеток вольвокса через этапы старения и смерти является частью генетически контролируемой эндогенной программы развития, а не пассивного процесса некроза. Вместо того, чтобы умирать случайным образом, независимо друг от друга, соматические клетки в пределах одного сфероида гибнут синхронно. Кроме того, потеря жизнеспособности сомы существенно задерживается, когда стареющую колонию вольвокса обрабатывают ингибитором синтеза белка циклогексимидом в концентрации 0.1 мкг/мл; в результате авторы (Pommerville, Kochert, 1982) сделали вывод, что гибель соматических клеток вольвокса является активным процессом. Однако они не указали, что при этом конкретно имели в виду.

Очень интересно, что у обеих форм *V. carteri* соматические клетки женских сфероидов подвергаются старению гораздо медленнее и умирают на

несколько дней позднее, чем соматические клетки бесполой сфероидов (Hagen, Kochert, 1980; Pommerville, Kochert, 1982). Авторы опять никак не объяснили этот результат. Однако мне представляется возможным предложить соответствующий комментарий с учетом специфики цикла полового онтогенеза вольвокса. В данном случае нет освобождения молодых сфероидов из стареющего каркаса родительской сомы. Дело в том, что после того, как содержащиеся в женском сфероиде яйцеклетки будут оплодотворены, образовавшиеся зиготы претерпевают длящийся несколько дней процесс созревания внутри материнского сфероида. Сначала зиготы имеют темно-зеленую окраску (светозависимый этап онтогенеза), а затем красную или оранжевую и окружаются тремя оболочками (Starr, 1969; Kirk, 1998). Соматические клетки умирают только после этого. Таким образом, цикл полового развития у всех видов вольвокса длится существенно дольше, чем цикл бесполого развития.

Важно, что если у молодого бесполого сфероида *V. carteri f. nagariensis* удалить гонидии, то получившийся в таком эксперименте молодой каркас соматических клеток будет развиваться и стареть с такой же скоростью, как и контрольные интактные сфероиды (Hagen, Kochert, 1980). На этом основании было сделано предположение, что развитие репродуктивных клеток не оказывает влияния на процессы терминальной дифференцировки, старения и смерти соматических клеток. Однако эта идея не согласуется с рассмотренными выше данными тех же авторов о замедлении темпов старения соматических клеток в женских сфероидах (содержащих яйцеклетки вместо бесполой гонидии). Было бы очень интересно проверить темпы старения каркаса сомы женского сфероида после экспериментального удаления из него яйцеклеток. Данные об отсутствии влияния яйцеклеток на процесс старения соматических клеток женской особи вольвокса дали бы основания предполагать наличие разных программ старения и смерти у сомы из бесполой и женских сфероидов. Кроме того, была высказана идея (Kirk, 1998) допускавшая принципиальную возможность, что на темпы старения сомы *V. carteri* мог бы оказывать влияние уже упомянутый выше половой феромон, который, таким образом, контролировал бы процессы онтогенеза не только у репродуктивных клеток, но также и у соматических.

В связи с рассмотренными выше данными по замедленным темпам старения соматических клеток женских сфероидов *V. carteri* представляется обоснованным упомянуть об особенностях старения сфероидов у нескольких линий *V. aureus*. Дело в том, что этот вид представлен не только линиями, для которых характерно половое размножение и формирование зигот (Darden, 1966; Starr, Zeikus, 1993), но также и линиями, в которых мужские

сфероиды отсутствуют или встречаются чрезвычайно редко (Darden, 1968; Starr, Zeikus, 1993; Desnitski, 2000). В культурах таких линий многие гонидии без оплодотворения постепенно трансформируются в предположительно гаплоидные партеноспоры (цитологический или генетический анализ не производили), хотя они имеют такой же внешний вид, как зрелые диплоидные зиготы, и также являются резистентной покоящейся стадией. Сфероиды *V. aureus*, содержащие партеноспоры, живут на несколько дней дольше, чем сфероиды с гонидиями (Desnitskiy, 2009). Таким образом, партеноспоровые линии этого вида вольвокса могли бы быть использованы для анализа особенностей старения их соматических клеток.

К сожалению, подробно рассмотренные выше исследования лаборатории Кохерта по старению соматических клеток у *V. carteri* не были им продолжены. Перейдем к данным других авторов, хотя изучение старения и смерти не всегда было основной темой их публикаций. В обстоятельном микроспектрофлуорометрическом исследовании (окраска DAPI) лаборатории А. Коулман (Coleman, Maguire, 1982) было показано, что у *V. aureus* и *V. carteri* f. *nagariensis* содержание ядерной ДНК в соматических клетках в ходе бесполого цикла развития остается постоянным от момента завершения дробления зародыша до самой смерти. У обоих видов вольвокса содержание хлоропластной ДНК в соматических клетках также существенно не изменяется в ходе дифференцировки и старения (в контрасте с резким увеличением содержания хлоропластной ДНК в растущих гонидиях).

В молекулярно-генетических исследованиях лаборатории Д. Керка были идентифицированы 12 транскриптов, специфичных для соматических клеток и 19 транскриптов, специфичных для гонидий *V. carteri* f. *nagariensis* (Tam, Kirk, 1991; Tam et al., 1991). Эти 12 соматических транскриптов разделяются на две категории: 5 “ранних”, которые активно аккумулируются, начиная с момента формирования соматических клеток непосредственно после дробления зародыша, и 7 “поздних”, которые не могут быть обнаружены до выхода молодых сфероидов из старой родительской особи. Однако авторы (Tam et al., 1991) сомневались, что “поздние соматические гены” играют решающую роль в старении сомы, поскольку период, в течение которого была максимальная аккумуляция поздних транскриптов, предшествует фазе старения. Интересно, что один из этих поздних соматических генов (ген *LSG2*) кодирует гликопротеиновый литический фермент, который аккумулируется в межклеточном гликопротеиновом матриксе развивающегося сфероида. Затем этот фермент принимает участие в деградации (частичном переваривании) матрикса, что позволяет освободиться сфероидам нового поколения (Nishimura et al., 2017). Таким образом, экспрес-

сия гена *LSG2* косвенно подготавливает основу для последующего старения каркаса соматических клеток.

Тем не менее, имеются публикации (Shimizu et al., 2001, 2002), показавшие более важную роль некоторых других поздних соматических генов у *V. carteri* f. *nagariensis* в процессе старения сомы. Так, например, был клонирован и изучен ген, кодирующий связанную со старением РНКазу. Соответствующая иРНК аккумулируется непосредственно в фазе старения соматических клеток, тогда как содержание тотальной клеточной РНК многократно уменьшается в ходе этого процесса. Очевидно, что такие результаты не согласуются с представлениями Керка и соавторов (Tam, Kirk, 1991; Tam et al., 1991) о роли поздних соматических генов в старении и смерти сомы.

Наконец, заслуживают упоминания данные о метакаспазах типа I и типа II у *V. carteri* f. *nagariensis* (Nedelcu, 2009b), протеолитических ферментах, играющих ключевую роль в процессе программированной клеточной смерти (ПКС) у низших эукариотов (Bidle, 2016; Durand et al., 2016).

Итак, после рассмотрения литературы по процессу старения и последующей гибели соматических клеток у вольвокса становится видно, что этот вопрос (несмотря на его актуальность) к настоящему времени изучен явно недостаточно. В литературе по онтогенезу вольвокса неоднократно отмечали, что его соматические клетки претерпевают ПКС (например, Nagen, Kochert, 1980; Kirk et al., 1987; Kirk, 1998). Однако авторы одного из последних обзоров по биологии развития этой зеленой водоросли указали, что они воздерживаются от использования термина ПКС, “поскольку он подразумевает стереотипный набор событий, определяемых процессом апоптоза в клетках животных, которые не были исследованы у *Volvox*” (Matt, Umen, 2016, p. 109).

Перейдем к проблеме, которая обычно не привлекает внимание исследователей: особенностям гибели гонидий у вольвокса. Более ста лет тому назад А. Вейсман (Weismann, 1904, p. 261) заметил, что гонидии (беспольные репродуктивные клетки, дающие начало новому поколению сфероидов вольвокса) являются потенциально бессмертными. Однако нельзя забывать, что при ограничении ресурсов (как в природных условиях, так и в условиях стареющих лабораторных культур) гонидии могут гибнуть, не давая потомства.

В связи со сказанным представляет интерес статья, содержащая некоторую информацию о беспольных репродуктивных клетках в переполненной стареющей культуре *V. carteri* f. *nagariensis* (Gilles, Jaenicke, 1982). В то время как в активно растущей культуре (с плотностью около 10 сфероидов на мл) сфероиды содержали обычно по 12–16 гонидий, в стареющей культуре (с плотностью

более 1000 сфероидов на мл) большинство сфероидов содержали по 8–12 гонидий. Мои многолетние наблюдения над культурами этого же вида и формы *Volvox* согласуются с данными цитированной выше работы в отношении числа гонидий у бесполовых сфероидов из молодых и старых культур. Более того, поддерживая в течение ряда лет культуры вольвокса, я наблюдал, что в стареющих культурах *V. carteri* f. *nagariensis* (через 2–3 нед. после пересева на свежую питательную среду) гонидии перестают вступать в период дробления, затем постепенно обесцвечиваются и в конце концов гибнут, разделяя судьбу соматических клеток (замечу, что музейные культуры вольвокса обычно поддерживают путем регулярных пересевов дважды в месяц).

В активно растущих (молодых) культурах *V. aureus* бесполое сфероида содержат по 3–15 гонидий (чаще 8–12) (Darden, 1966; Shelton et al., 2012 и др.). С другой стороны, мои многолетние наблюдения показали, что в старых культурах *V. aureus* (примерно через 3–4 нед. после пересева на свежую среду) формируются миниатюрные бесполое сфероида, содержащие лишь 1–3 гонидии. Таким образом, в данном случае нет прекращения процесса бесполого размножения, имеющего место в старых культурах *V. carteri* f. *nagariensis*. Однако эти старые культуры *V. aureus* не являются переполненными, что дает основания полагать гибель значительной части популяции на фоне формирования относительно небольшого количества миниатюрных особей, способных впоследствии дать нормальное потомство после пересева на свежую среду. В связи со сказанным уместно вспомнить о публикациях, развивающих концепцию “альтруистической” клеточной гибели у некоторых одноклеточных протистов в стрессовых ситуациях (Durand et al., 2011, 2014; Nedelcu et al., 2011), когда часть популяции гибнет, поддерживая выживание и размножение остальных особей. Однако в настоящий момент трудно оценить, насколько мои упомянутые выше предварительные и неопубликованные данные на стареющих культурах *V. aureus* укладываются в рамки концепции альтруистической клеточной гибели. В будущем было бы интересно изучить этот вопрос подробнее.

Как бы то ни было, *V. aureus* и *V. carteri* f. *nagariensis*, характеризуются не только разными репродуктивными стратегиями в оптимальных условиях культивирования (как указано выше в разделе о развитии и дифференцировке клеток у этих водорослей), но также и разными стратегиями выживания при ограничении ресурсов в стареющих культурах. У *V. carteri* f. *nagariensis* дробление гонидий в таких культурах блокируется, но в течение относительно короткого времени (несколько дней) все репродуктивные клетки сохраняют способность начать новую серию делений (если условия

улучшатся). У *V. aureus* способность к формированию новых колоний сохраняется в неблагоприятных условиях гораздо дольше (более месяца), но бесполое размножение происходит только у относительно небольшого числа особей. Это согласуется с моими исследованиями по экологии вольвокса (Desnitskiy, 2016, 2017, 2020), которые показывают, что *V. aureus*, единственный космополитный и наиболее часто встречающийся в природе представитель данного рода водорослей, лучше других видов адаптирован к жизни в суб-оптимальных и суб-экстремальных условиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вольвокс стал перспективным модельным объектом, который успешно используют для изучения процессов дифференцировки и морфогенеза в относительно простой системе, состоящей лишь из двух типов клеток. Однако настоящий обзор сведений о старении и гибели клеток у этой зеленой водоросли показывает, что данная тема к настоящему времени разработана весьма слабо и желательны дальнейшие исследования. Прежде всего было бы важно четко определить и подробно охарактеризовать разные этапы старения сомы как в ходе бесполого цикла развития, так и в онтогенезе колоний, формирующих резистентные покоящиеся стадии (зиготы или партеноспоры). Заслуживает внимания также и более подробный анализ процесса старения лабораторных культур вольвокса и гибели гонидий, происходящей при ограничении питательных ресурсов.

Род *Volvox* характеризуется значительным разнообразием особенностей циклов развития. Поэтому в будущем для экспериментального анализа процессов старения и гибели клеток было бы оптимальным применить сравнительный подход и использовать не только *V. carteri* (наиболее изученный вид), но также и другие виды (прежде всего *V. aureus*).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bhatia-Dey N., Kanherkar R.R., Stair S.E. et al. Cellular senescence as the causal nexus of aging // *Front. Genet.* 2016. V. 7:13.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00013>

- Bidle K.D.* Programmed cell death in unicellular phytoplankton // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. № 13. P. R594–R607.
- Brusentsev E.Y., Tikhonova M.A., Herbeck Y.E. et al.* Developmental aspects of senescence // *Russ. J. Dev. Biol.* 2017. V. 48. № 2. P. 93–105.
- Cheng Q., Pappas V., Hallmann A. et al.* Hsp70A and GlsA interact as partner chaperones to regulate asymmetric division in *Volvox* // *Dev. Biol.* 2005. V. 286. № 2. P. 537–548.
- Choi G., Przybylska M., Straus D.* Three abundant germ line-specific transcripts in *Volvox carteri* encode photosynthetic proteins // *Curr. Genet.* 1996. V. 30. № 4. P. 347–355.
- Coggin S.J., Kochert G.* Flagellar development and regeneration in *Volvox carteri* (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 1986. V. 22. № 3. P. 370–381.
- Coleman A.W.* A comparative analysis of the Volvocaceae (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 2012. V. 48. № 3. P. 491–513.
- Coleman A.W., Maguire M.J.* A microspectrofluorometric analysis of nuclear and chloroplast DNA in *Volvox* // *Dev. Biol.* 1982. V. 94. № 2. P. 441–450.
- Darden W.H.* Sexual differentiation in *Volvox aureus* // *J. Protozool.* 1966. V. 13 № 2. P. 239–255.
- Darden W.H.* Production of male-inducing hormone by a parthenosporic *Volvox aureus* // *J. Protozool.* 1968. V. 15. № 3. P. 412–414.
- Davaapil H., Brockes J.P., Yun M.H.* Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development // *Development.* 2017. V. 144. № 1. P. 106–114.
- Deponte M.* Programmed cell death in protists // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1783. № 7. P. 1396–1405.
- Desnitskiy A.G.* Cellular mechanisms of the evolution of ontogeny in *Volvox* // *Arch. Protistenkd.* 1992. V. 141. № 3. P. 171–178.
- Desnitskiy A.G.* A review on the evolution of development in *Volvox* – morphological and physiological aspects // *Europ. J. Protistol.* 1995. V. 31. № 3. P. 241–247.
- Desnitskiy A.G.* Development and reproduction of two species of the genus *Volvox* in a shallow temporary pool // *Protistology.* 2000. V. 1. № 4. P. 195–198.
- Desnitskiy A.G.* *Volvox* (Chlorophyta, Volvocales) as a model organism in developmental biology // *Russ. J. Dev. Biol.* 2009. V. 40. № 4. P. 238–241.
- Desnitskiy A.G.* Major ontogenetic transitions during *Volvox* (Chlorophyta) evolution: when and where might they have occurred? // *Dev. Genes Evol.* 2016. V. 226. № 5. P. 349–354.
- Desnitskiy A.G.* On ecological aspects of the evolutionary reorganizations of *Volvox* ontogeny // *Int. J. Plant Reprod. Biol.* 2017. V. 9. № 2. P. 183–186.
- Desnitskiy A.G.* Comparative analysis of embryonic inversion in algae of the genus *Volvox* (Volvocales, Chlorophyta) // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. № 3. P. 129–133.
- Desnitskiy A.G.* Advances in the research of sexual reproduction in colonial volvocine algae // *Russ. J. Dev. Biol.* 2019. V. 50. № 5. P. 225–229.
- Desnitskiy A.G.* Algae of the genus *Volvox* (Chlorophyta) in sub-extreme habitats // *Int. J. Plant Reprod. Biol.* 2020. V. 12. № 2. P. 156–158.
- Desnitskiy A.G., Sym S., Durand P.M.* On the contribution of Mary Agard Pocock to developmental biology research of the genus *Volvox* L. // *Trans. Roy. Soc. South Afr.* 2018. V. 73. № 3. P. 277–282.
- Doronina T.V., Sheval E.V., Lazareva E.M.* Programmed cell death during the formation of embryo sac and seed // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. № 3. P. 135–147.
- Duncan L., Nishii I., Harryman A. et al.* The *VARL* gene family and the evolutionary origins of the master cell-type regulatory gene, *regA*, in *Volvox carteri* // *J. Mol. Evol.* 2007. V. 65. № 1. P. 1–11.
- Durand P.M., Rashidi A., Michod R.E.* How an organism dies affects the fitness of its neighbors // *Am. Nat.* 2011. V. 177. № 2. P. 224–232.
- Durand P.M., Choudhury R., Rashidi A. et al.* Programmed death in a unicellular organism has species-specific fitness effects // *Biol. Lett.* 2014. V. 10. № 2. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.1088>
- Durand P.M., Sym S., Michod R.E.* Programmed cell death and complexity in microbial systems // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. № 13. P. R587–R593.
- Franklin D.J., Brussaard C.P.D., Berges J.A.* What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? // *Eur. J. Phycol.* 2006. V. 41. № 1. P. 1–14.
- Gilles R., Jaenicke L.* Differentiation in *Volvox carteri*: study of pattern variation of reproductive cells // *Zeitschr. Naturforsch.* 1982. V. 37. № 10. P. 1023–1030.
- Goldsmith T.C.* Is the evolutionary programmed/non-programmed aging argument moot? // *Curr. Aging Sci.* 2015. V. 8. № 1. P. 41–45.
- Golstein P., Aubry L., Levraud J.-P.* Cell-death alternative model organisms: why and which? // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. № 10. P. 798–807.
- Gordeeva A.V., Labas Y.A., Zvyagilskaya R.A.* Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. № 10. P. 1055–1066.
- Grochau-Wright Z.I., Hanschen E.R., Ferris P.J. et al.* Genetic basis for soma is present in undifferentiated volvocine green algae // *J. Evol. Biol.* 2017. V. 30. № 6. P. 1205–1218.
- Guo Y. Gan S.* Leaf senescence: signals, execution, and regulation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005. V. 71. P. 83–112.
- Guzman-Lopez J.A., Abraham-Juarez M.J., Lozano-Sotomayor P. et al.* *Arabidopsis thaliana* gonidialess A/Zuotin related factors (GlsA/ZRF) are essential for maintenance of meristem integrity // *Plant Mol. Biol.* 2016. V. 91. № 1–2. P. 37–51.
- Hagen G., Kochert G.* Protein synthesis in a new system for the study of senescence // *Exp. Cell Res.* 1980. V. 127. № 2. P. 451–457.
- Hallmann A.* Evolution of reproductive development in the volvocine algae // *Sex. Plant Reprod.* 2011. V. 24. № 2. P. 97–112.
- Hanschen E.R., Ferris P.J., Michod R.E.* Early evolution of the genetic basis for soma in the Volvocaceae // *Evolution.* 2014. V. 68. № 7. P. 2014–2025.

- Herron M.D. Origins of multicellular complexity: *Volvox* and the volvocine algae // *Mol. Ecol.* 2016. V. 25. № 6. P. 1213–1223.
- Herron M.D., Michod R.E. Evolution of complexity in the volvocine algae: transitions in individuality through Darwin's eye // *Evolution.* 2008. V. 62. № 2. P. 436–451.
- Herron M.D., Desnitskiy A.G., Michod R.E. Evolution of developmental programs in *Volvox* (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 2010. V. 46. № 2. P. 316–324.
- Herron M.D., Nedelcu A.M. Volvocine algae: from simple to complex multicellularity // *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* / Eds. Ruiz-Trillo I., Nedelcu A.M. Dordrecht (the Netherlands): Springer, 2015. P. 129–152.
- Hoops H.J., Nishii I., Kirk D.L. Cytoplasmic bridges in *Volvox* and its relatives // *Cell–Cell Channels* / Eds. Baluska F., Volkmann D., Barlow P. Georgetown (Texas): Landes Bioscience, 2006. P. 65–84.
- Igawa T., Hoshino Y., Yanagawa Y. Isolation and characterization of the plant *glsA* promoter from *Alstroemeria* // *Plant Biol.* 2009. V. 11. № 6. P. 878–885.
- Karn R.C., Starr R.C., Hudock G.A. Sexual and asexual differentiation in *Volvox obversus* (Shaw) Printz, strains WD3 and WD7 // *Arch. Protistenkd.* 1974. V. 116. № 1–2. P. 142–148.
- Kasuba K.C., Vavilala S.L., D'Souza J.S. Apoptosis-like cell death in unicellular photosynthetic organisms – a review // *Algal Res.* 2015. V. 12. P. 126–133.
- Kirk D.L. *Volvox*: Molecular-Genetic Origins of Multicellularity and Cellular Differentiation. N.Y.: Cambridge Univ. Press, 1998. 381 p.
- Kirk D.L. Germ-soma differentiation in *Volvox* // *Dev. Biol.* 2001. V. 238. № 2. P. 213–223.
- Kirk D.L. A twelve-step program for evolving multicellularity and a division of labor // *BioEssays.* 2005. V. 27. № 3. P. 299–310.
- Kirk D.L., Baran G.J., Harper J.F. et al. Stage-specific hypermutability of the *regA* locus of *Volvox*, a gene regulating the germ-soma dichotomy // *Cell.* 1987. V. 48. № 1. P. 11–24.
- Kirk M.M., Ransick A., McRae S.E. et al. The relationship between cell size and cell fate in *Volvox carteri* // *J. Cell Biol.* 1993. V. 123. № 1. P. 191–208.
- Kirk M.M., Stark K., Miller S.M. et al. *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein // *Development.* 1999. V. 126. № 4. P. 639–647.
- Kochert G. Developmental mechanisms in *Volvox* reproduction // *The developmental biology of reproduction* / Eds. Markert C.L., Papaconstantinou J. N.Y., San Francisco, London: Acad. Press, 1975. P. 55–90.
- Koufopanou V. The evolution of soma in the Volvocales // *Amer. Nat.* 1994. V. 143. № 5. P. 907–931.
- Koufopanou V., Bell G. Soma and germ: an experimental approach using *Volvox* // *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* 1993. V. 254. № 1340. P. 107–113.
- König S.G., Nedelcu A.M. The genetic basis for the evolution of soma: mechanistic evidence for the co-option of a stress-induced gene into a developmental master regulator // *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 2020. V. 287: 20201414. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1414>
- Locato V., De Gara L. Programmed cell death in plants: an overview // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1743. P. 1–8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3_1)
- Matt G., Umen J. *Volvox*: A simple algal model for embryogenesis, morphogenesis and cellular differentiation // *Dev. Biol.* 2016. V. 419. № 1. P. 99–113.
- Matt G.Y., Umen J.G. Cell-type transcriptomes of the multicellular green alga *Volvox carteri* yield insights into the evolutionary origins of germ and somatic differentiation programs // *G3 (Bethesda)* // 2018. V. 8. № 2. P. 531–550.
- Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama T. et al. Identification of higher plant *GlsA*, a putative morphogenesis factor of gametic cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 306. № 2. P. 564–569.
- Nedelcu A.M. Environmentally induced responses co-opted for reproductive altruism // *Biol. Lett.* 2009a. V. 5. № 6. P. 805–808.
- Nedelcu A.M. Comparative genomics of phylogenetically diverse unicellular eukaryotes provide new insights into the genetic basis for the evolution of the programmed cell death machinery // *J. Mol. Evol.* 2009b. V. 68. № 3. P. 256–268.
- Nedelcu A.M., Michod R.E. The evolutionary origin of an altruistic gene // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. № 8. P. 1460–1464.
- Nedelcu A.M., Driscoll W.W., Durand P.M. et al. On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world // *Evolution.* 2011. V. 65. № 1. P. 3–20.
- Nishimura M., Nagashio R., Sato Y. et al. Late somatic gene 2 disrupts parental spheroids cooperatively with *Volvox* hatching enzyme A in *Volvox* // *Planta.* 2017. V. 245. № 1. P. 183–192.
- Nozaki H. Morphology, sexual reproduction and taxonomy of *Volvox carteri* f. *kawasakiensis* f. nov. (Chlorophyta) from Japan // *Phycologia.* 1988. V. 27. № 2. P. 209–220.
- Nozaki H., Matsuzaki R., Yamamoto K. et al. Delineating a new heterothallic species of *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae) using new strains of “*Volvox africanus*” // *PLoS One.* 2015. V. 10(11): e0142632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142632>
- Nozaki H., Takusagawa M., Matsuzaki R. et al. Morphology, reproduction and taxonomy of *Volvox dissipatrix* (Chlorophyceae) from Thailand, with a description of *Volvox zeikusii* sp. nov. // *Phycologia.* 2019. V. 58. № 2. P. 192–199.
- Nozaki H., Mahakham W., Heman W. et al. A new preferentially outcrossing monoicous species of *Volvox* sect. *Volvox* (Chlorophyta) from Thailand // *PLoS One.* 2020. V. 15(7): e0235622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235622>
- Pall M.L. Mutants of *Volvox* showing premature cessation of division: evidence for a relationship between cell size and reproductive cell differentiation // *Developmental Biology: Pattern Formation, Gene Regulation* / Eds. McMahon D., Fox C.F. Menlo Park (California): W.A. Benjamin, Inc., 1975. P. 148–156.
- Pappas V., Miller S.M. Functional analysis of the *Volvox carteri* asymmetric division protein *GlsA* // *Mech. Dev.* 2009. V. 126. № 10. P. 842–851.

- Pommerville J.C., Kochert G.* Changes in somatic cell structure during senescence of *Volvox carteri* // *Europ. J. Cell Biol.* 1981. V. 24. № 2. P. 236–243.
- Pommerville J.C., Kochert G.* Effects of senescence on somatic cell physiology in the green alga *Volvox carteri* // *Exp. Cell Res.* 1982. V. 140. № 1. P. 39–45.
- Rogers H.J.* Senescence-associated programmed cell death // *Plant Programmed Cell Death* / Eds. Gunawardena A.N., McCabe P.F. Cham (Switzerland): Springer, 2015. P. 203–233.
- Shelton D.E., Desnitskiy A.G., Michod R.E.* Distribution of reproductive and somatic cell numbers in diverse *Volvox* (Chlorophyta) species // *Evol. Ecol. Res.* 2012. V. 14. № 6. P. 707–721.
- Shimizu T., Inoue T., Shiraishi H.* A senescence-associated S-like RNase in the multicellular green alga *Volvox carteri* // *Gene.* 2001. V. 274. № 1–2. P. 227–235.
- Shimizu T., Inoue T., Shiraishi H.* Cloning and characterization of novel extensin-like cDNAs that are expressed during late somatic cell phase in the green alga *Volvox carteri* // *Gene.* 2002. V. 284. № 1–2. P. 179–187.
- Skulachev M.V., Skulachev V.P.* Programmed aging of mammals: proof of concept and prospects of a biochemical approach for antiaging therapy // *Biochemistry (Moscow).* 2017. V. 82. № 12. P. 1403–1422.
- Soyer M.-O.* Complément à l'étude ultrastructurale des Volvocales. Étude des colonies femelles de *Volvox aureus* E. // *Ann. Sci. Natur. Zool. (Ser. 12).* 1973. V. 15. № 2. P. 231–258.
- Stark K., Kirk D.L., Schmitt R.* Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri* // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 11. P. 1449–1460.
- Starr R.C.* Structure, reproduction and differentiation in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar, strains HK9 and 10 // *Arch. Protistenkd.* 1969. V. 111. № 3–4. P. 204–222.
- Starr R.C.* Control of differentiation in *Volvox* // *Dev. Biol.* 1970. Suppl. 4. P. 59–100.
- Starr R.C.* Meiosis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* // *Arch. Protistenkd.* 1975. V. 117. № 1–2. P. 187–191.
- Starr R.C., Zeikus J.A.* UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 list of cultures // *J. Phycol.* 1993. V. 29. Suppl. to № 2. P. 1–106.
- Tam L.-W., Kirk D.L.* Identification of cell-type-specific genes of *Volvox carteri* and characterization of their expression during the asexual life cycle // *Dev. Biol.* 1991. V. 145. № 1. P. 51–66.
- Tam L.-W., Stamer K.A., Kirk D.L.* Early and late gene expression programs in developing somatic cells of *Volvox carteri* // *Dev. Biol.* 1991. V. 145. № 1. P. 67–76.
- Umen J.G.* *Volvox* and volvocine green algae // *EvoDevo.* 2020. V. 11:13. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00158-7>
- van Doorn W.G., Woltering E.J.* Senescence and programmed cell death: substance or semantics? // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 406. P. 2147–2153.
- Weismann A.* *The Germ-Plasm. A Theory of Heredity.* N.Y.: Charles Scribner's Sons, 1893. 477 p.
- Weismann A.* *The Evolution Theory. Volume 1.* London: Edward Arnold, 1904. 416 p.
- Woo H.R., Kim H.J., Lim P.O. et al.* Leaf senescence: systems and dynamics aspects // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 347–376.
- Yates I., Darley M., Kochert G.* Separation of cell types in synchronized cultures of *Volvox carteri* // *Cytobios.* 1975. V. 12. № 47–48. P. 211–223.
- Zhu Y., Liu X., Ding X. et al.* Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction // *Biogerontology.* 2019. V. 20. № 1. P. 1–16.

## ***Volvox* as a Model for Studying Cell Death and Senescence**

**A. G. Desnitskiy\*, \*\***

*Department of Embryology, Saint-Petersburg State University,  
Universitetskaya nab. 7/9, Saint-Petersburg, 190034 Russia*

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

*\*\*e-mail: a.desnitskiy@spbu.ru*

The spherical green alga *Volvox* consists of several hundred or thousand of somatic cells that undergo terminal differentiation, senescence and death, and a small number of gonidia (asexual reproductive cells) that give rise to the next generation. In the first part of this paper, the ontogenetic diversity of the genus *Volvox* is briefly considered, as well as the mechanisms of differentiation into the two types of cells mentioned above, which have been thoroughly studied during recent years in *Volvox carteri*. Then, a detailed critical analysis of the literature and some of my own data on senescence and cell death (mainly in *V. carteri* and, to a lesser extent, in *V. aureus*) was carried out, and it was noted that this aspect of *Volvox* developmental biology has not been sufficiently studied. Some perspectives of further research of the processes of cell death and senescence in representatives of the genus *Volvox* in a comparative aspect are indicated.

*Keywords:* cell death, cell differentiation, cell divisions, developmental cycles, senescence, *Volvox*

## МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 576.08;57.085.23;577.2

### МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2021 г. А. В. Кузнецова<sup>а</sup>, \*, Л. А. Ржанова<sup>а</sup>, М. А. Александрова<sup>а</sup>

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

\*e-mail: avkuzn@list.ru

Поступила в редакцию 15.10.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 26.12.2020 г.

Дедифференцировка и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека, а также участие клеток в неоваскуляризации сетчатки и хориоидеи лежит в основе развития различных офтальмологических заболеваний, которые приводят к серьезной потере зрения. Понимание клеточно-молекулярных механизмов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток РПЭ, а также выявление роли клеток РПЭ в ангиогенезе глаз, поможет определить новые терапевтические мишени для лечения офтальмопатологии. Открытие того, что короткие некодирующие РНК – малые интерферирующие РНК (siRNAs) и микроРНК (miRNAs) – участвуют в регуляции генов, способствовало появлению исследований, направленных на изучение роли siRNAs в ингибировании экспрессии генов в клетках РПЭ, задействованных в ангиогенезе глаз, а также выявления роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ. Возможность локальной доставки коротких некодирующих РНК непосредственно в глаз может быть полезным в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний.

**Ключевые слова:** ретинальный пигментный эпителий, siRNA, miRNA, эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, VEGF, хориоидальная неоваскуляризация, неоваскулярные заболевания глаз, витреоретинальные заболевания, возрастная макулярная дегенерация

**DOI:** 10.31857/S0475145021030058

#### ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) обеспечивает необходимую поддержку как фоторецепторным клеткам нейральной сетчатки, так и сосудистой оболочке глаза. Повреждение клеток РПЭ человека лежит в основе развития различных офтальмологических заболеваний, которые приводят к серьезной потере зрения. С одной стороны, дедифференцировка и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток РПЭ играет ключевую роль в патогенезе таких заболеваний, как пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) и пролиферативная диабетическая ретинопатия (Adijanto et al., 2012; Chen et al., 2014; Li et al., 2016b; Kaneko, Terasaki, 2017; Cui et al., 2019). С другой, участие клеток РПЭ в патологическом ангиогенезе глаз – в неоваскуляризации сетчатки и хориоидеи – лежит в основе внутриглазных неоваскулярных заболеваний, таких как диабетическая ретинопатия и влажная форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД) (Chen et al., 2013; Yang et al., 2015; Askou et al., 2015; Cabral et al., 2017). Понимание клеточно-молекулярных механизмов, задействованных в регуляции дифферен-

цировки клеток РПЭ, а также выявление их роли в ангиогенезе глаз, поможет определить новые терапевтические мишени для лечения указанных заболеваний.

Открытие процесса РНК-интерференции (англ. RNAi), в результате которого малые интерферирующие РНК (англ. small interfering RNAs, siRNAs) могут заглушать или подавлять экспрессию определенных генов после транскрипции, и того, что некодирующая ДНК (англ. non-coding DNA) или “мусорная” ДНК (англ. junk DNA) транскрибируется, и среди этих транскриптов микроРНК (англ. microRNAs, miRNAs) могут подавлять трансляцию с информационных РНК (англ. messenger RNA, мРНК), способствовало появлению исследований, направленных на выявление роли малых некодирующих РНК в норме и при патологии различных органов и тканей, а также в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра заболеваний (Lam et al., 2015; Ahmadzada et al., 2018), включая заболевания глаз (Donato et al., 2018).

siRNAs и miRNAs имеют много общего, но их механизмы действия и клинические применения

различны (Lam et al., 2015). siRNAs и miRNAs во многом сходны по физико-химическим свойствам, обе являются короткими дуплексными молекулами РНК, которые подавляют активность генов-мишеней на посттранскрипционном уровне (Lam et al., 2015). Основное различие между siRNAs и miRNAs состоит в том, что первые обладают высокой специфичностью только к одной мРНК, тогда как вторые имеют несколько мишеней (Lam et al., 2015). Благодаря удобному использованию и специфичности при нокдауне генов, siRNAs постепенно заменили традиционные методы нокдауна генов, и, в настоящее время, они применяются для целенаправленного подавления конкретных генов (Chen et al., 2013). miRNAs подавляют экспрессию ряда генов-мишеней, которые часто работают вместе как сеть в рамках одного и того же сигнального пути или клеточного процесса (Lam et al., 2015; Shahriari et al., 2020). Эта способность miRNAs позволяет их рассматривать не только в качестве терапевтических средств для ряда заболеваний, в том числе сложных мультигенных заболеваний, но и в качестве прогностических биомаркеров (Lam et al., 2015). Поскольку siRNAs и miRNAs могут подавлять экспрессию практически всех генов и их транскриптов мРНК, они имеют преимущества над препаратами на основе малых молекул, воздействующих только на определенные классы белков, и препаратов на основе белков, включая высокоспецифичные моноклональные антитела, мишени которых в основном ограничены рецепторами на поверхности клетки или циркулирующими белками (Lam et al., 2015).

#### siRNA В ПОДАВЛЕНИИ ПРОАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Учитывая удобное расположение для локальной доставки терапевтических агентов, РПЭ является многообещающим местом-мишенью для снижения экспрессии ангиогенных факторов и предотвращения хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при лечении ВМД и других неоваскулярных заболеваний глаз (Chen et al., 2013). В настоящее время идет поиск мишеней в клетках РПЭ человека с целью блокирования неоваскуляризации с помощью siRNAs для лечения указанных заболеваний. В ряде работ показано, что в ангиогенезе влажной формы ВМД и диабетической ретинопатии важную роль играет ядерный фактор транскрипции-каппа В (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) (Yang et al., 2015; Luo et al., 2018). NF-κB активируется в ответ на различные стимулы – воспалительные цитокины, клеточный стресс, а также факторы роста (см. рис. 1) (Yang et al., 2015), и не активируется при подавлении экспрессии морфологических и биохимических маркеров, например retinal

pigment epithelium-specific protein 65kDa (RPE65) (Cottet et al., 2005). Так, в работе Коттет и соавт. (Cottet et al., 2005), выполненной на клеточной линии РПЭ взрослого человека ARPE-19, не выявлено изменений в активности NF-κB при нокдауне RPE65 с помощью siRNA. В свою очередь NF-κB регулирует большое число генов, многие из которых являются критическими для выживания клеток. Кроме того, NF-κB регулирует экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины (например, интерлейкин 8 (англ. interleukin 8, IL-8), фактор некроза опухоли-α (англ. tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)), молекулы адгезии, ангиогенные факторы (например, фактора роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor, VEGF)) и ферменты деградации внеклеточного матрикса (например, металлопротеиназа-9 (англ. matrix metalloproteinase 9, MMP-9)), активность которых связана с миграцией клеток. Так, в работе Луо и соавт. (Luo et al., 2018) показано, что ингибирование каскада передачи сигналов внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (англ. extracellular signal-regulated kinases (ERK))/p38/NF-κB с помощью кинсенозида (англ. kinsenoside), активного лекарственного компонента, полученного из травы традиционной китайской медицины *Anoectochilus roxburghii*, способствовало снижению экспрессии VEGF в клетках ARPE-19, обработанных перекисью водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Другой подход для подавления функции NF-κB в клетках линии РПЭ человека D407 был использован Янг и соавт. (Yang et al., 2015). Исследователи использовали siRNA для нокдауна ключевой активной субъединицы p65 в транскрипции NF-κB (Yang et al., 2015). Однако большинство работ по использованию siRNAs для лечения влажной формы ВМД направлены на подавление в клетках РПЭ непосредственно экспрессии VEGF, ответственного за проницаемость и рост новых сосудов хориоидеи по направлению к сетчатке и ключевого компонента патогенеза CNV, предшественника ВМД (Garba, Mousa, 2010). В качестве лекарственных препаратов-кандидатов siRNA для лечения влажной формы ВМД были предложены бевазирианиб (англ. bevasiranib, ранее известный как Cand5) и AGN211745 (альтернативные названия: Sirna-027, AGN-745) (Lam et al., 2015; Saw, Song, 2020), нацеленные соответственно на VEGF (Garba, Mousa, 2010) и его рецептор 1 (VEGFR-1) (Kaiser et al., 2010). VEGFR-1 обнаруживается в основном на эндотелиальных клетках сосудов и стимулируется как VEGF, так и фактором роста плаценты (англ. placental growth factor, PlGF), что приводит к росту новых кровеносных сосудов. Однако разработка этих препаратов была прекращена. Клинические испытания бевазирианиба были остановлены на III фазе (ClinicalTrials.gov NCT00557791), а AGN-745 – на II фазе (ClinicalTrials.gov NCT00395057) в связи с

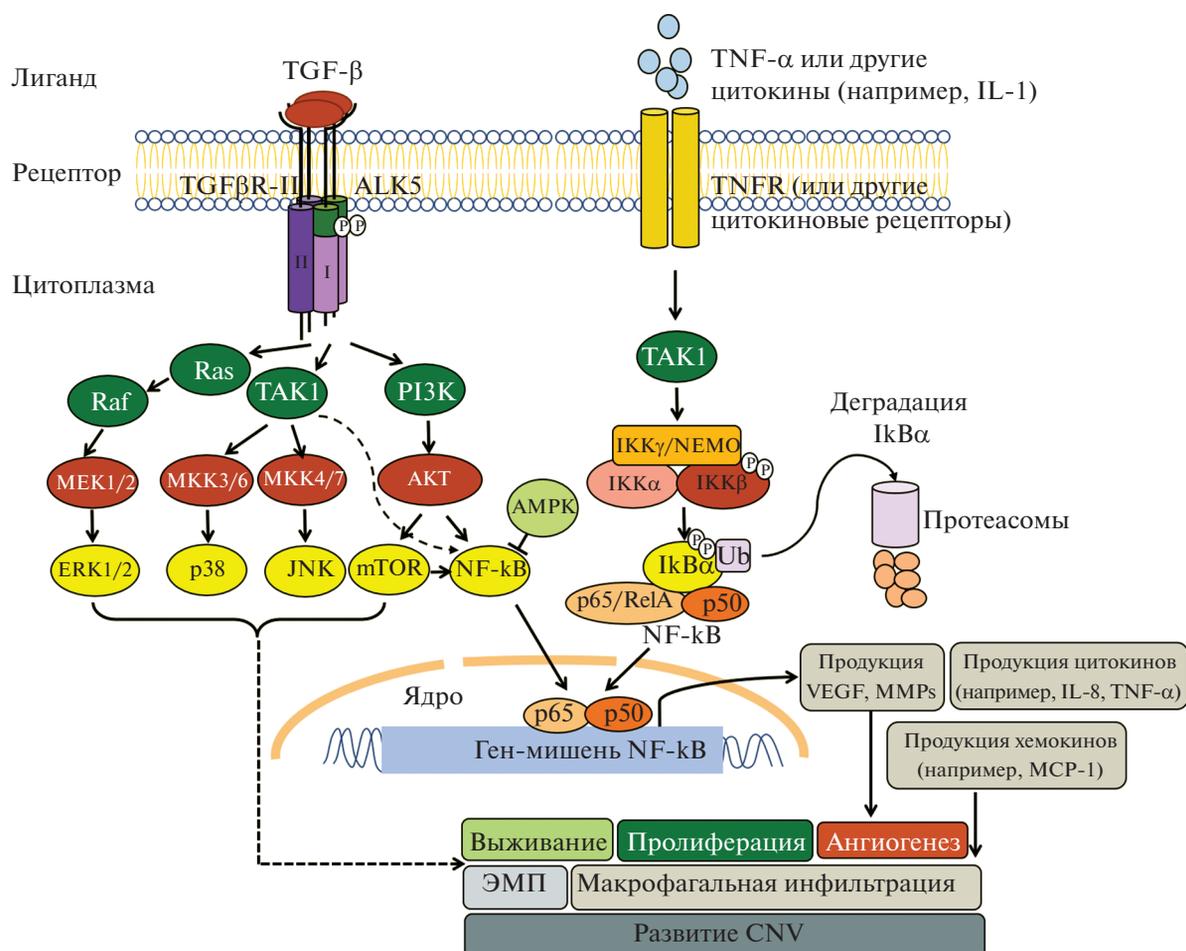
неэффективностью препаратов, они не улучшали остроту зрения. Еще одним препаратом-кандидатом для лечения влажной формы ВМД предложен PF-04523655 (другое название: PF-655). PF-655 представляет собой стабилизированную синтетическую химически модифицированную siRNA. Препарат подавляет экспрессию связанного со стрессом белка RTP801 (также известный как REDD1 и кодируемый *DDIT4*), запускаемую неблагоприятными условиями микроокружения (окислительным стрессом). RTP801 ингибирует мишень рапамицина у млекопитающих (англ. mammalian target of rapamycin, mTOR) и АКТ (англ. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha) путем стабилизации ингибиторного комплекса (англ. tuberous sclerosis complex, TSC1/TSC2) и усиливает гибель клеток (Shoshani et al., 2002; Yoshida et al., 2010; Canal et al., 2014). Препарат прошел II фазу клинических испытаний (ClinicalTrials.gov NCT00713518), в котором показал увеличение средней остроты зрения в течение первых 3 мес. Однако о дальнейшей судьбе препарата пока не известно.

Исследования вклада siRNAs в подавлении активности генов продолжаются и результаты подтверждают потенциальную ценность этого класса некодирующей РНК в качестве нового терапевтического агента. Однако применение siRNAs также, как и miRNAs, в настоящее время еще имеет существенные ограничения. Они связаны не только с разработкой самого препарата: плохая стабильность *in vivo* (деградация эндогенными нуклеазами), проблемы с доставкой, эффекты нецелевого действия, в том числе нежелательный иммунный ответ, высокая стоимость производства, но и с выявлением продолжительности эффекта подавления активности генов (Lam et al., 2015). Кроме того, ограничения использования siRNAs связаны с выявлением конкретных генов, которые непосредственно вовлечены в патологический процесс. Так, общепризнано, что VEGF участвует в развитии и прогрессировании ВМД. Ряд авторов считает, что увеличение концентрации VEGF оказывает прямое неблагоприятное влияние на РПЭ и фоторецепторы (Terasaki et al., 2013; Ablonczy et al., 2014). Однако в других работах показана критическая роль VEGF не только в поддержании выживания и функционировании нейрональных клеток сетчатки (Nishijima et al., 2007; Saint-Geniez et al., 2008), но и в выживании и поддержании целостности РПЭ (Ford et al., 2011). Так, нейтрализация VEGF *in vitro* приводила к увеличению апоптоза и уменьшению плотности и длины микроворсинок клеток ARPE-19, а системная нейтрализация VEGF у мышей – к преходящим дегенеративным изменениям: вакуолизации РПЭ, отделению клеток от наружных сегментов фоторецепторов и уменьшению хориокапиллярных фенестраций (Ford et al., 2011). В экспери-

ментах по подавлению экспрессии VEGF с помощью siRNA в клеточной линии Мюллеровой глии приводило к значительной гибели клеток, тогда как добавление экзогенного VEGF к свежeweделенным фоторецепторным клеткам и экспланта-там внешнего ядерного слоя способствовало их выживанию (Saint-Geniez et al., 2008). Эти результаты указывают на важную роль эндогенного VEGF в поддержании и функционировании нейрональных клеток сетчатки и РПЭ взрослого человека и указывают на то, что терапию против VEGF следует применять с осторожностью. В дополнении к этому, результаты говорят о необходимости более тщательного изучения вклада VEGF в патогенез ВМД.

### РОЛЬ miRNA В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА КЛЕТКИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

В настоящее время данные об экспрессии miRNA в сетчатке получены в основном из анализа мышинового miRNA transcriptome (miRNome), следовательно при переносе полученных данных на человека нужно учитывать структурные и функциональные различия между сетчаткой человека и мыши (Sundermeier, Palczewski, 2016; Donato et al., 2018). В геноме человека закодировано несколько тысяч miRNAs, образующих обширную регуляторную сеть, которая задействована в самых разных сигнальных путях и клеточных процессах (Shahriari et al., 2020). Кроме того, miRNAs существуют в экзосомах, и экзосомальные miRNAs могут доставляться в клетки-реципиенты в качестве сигнальных молекул (Zhang et al., 2019). Учитывая плейотропную природу регуляторных функций miRNA, в которых одна miRNA может нацеливаться на десятки или сотни транскриптов, регуляция miRNAs или miRNA-процессорных ферментов во время развития и заболеваний может привести к различным клеточным фенотипам (Shahriari et al., 2020). Так, в ряде работ на клетках РПЭ, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ESCs) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) человека, показано, что уровень экспрессии определенных miRNAs можно использовать в качестве индикатора для созревания РПЭ (Hu et al., 2012; Shahriari et al., 2020). Поскольку miRNAs динамически регулируются во время дифференцировки ESCs или iPSCs в РПЭ, степень дифференцировки РПЭ может быть измерена путем профилирования специфических паттернов экспрессии miRNAs (Hu et al., 2012; Shahriari et al., 2020). В этих работах показано, что в процессе дифференцировки клеток РПЭ из ESCs человека miRNAs, связанные с плюрипотентностью, такие как miR-302–367 кластер



**Рис. 1.** Схематическое изображение перекрестной передачи сигналов между активированными каноническим NF-κB и неканоническими TGF-β путями во время развития хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В отсутствие сигнала димеры NF-κB (например, p65/RelA–p50), связанные IκBα (ингибитор NF-κB alpha, англ. NF-κB inhibitor, alpha), располагаются в цитоплазме клеток РПЭ. При воздействии различных сигнальных молекул (например, TNF-α, TGF-β) происходит активация члена семейства MAPK киназ-киназ – TGF-β-активированной киназы 1 (TAK1, англ. TGF-β-activated kinase 1, другие названия: MAPK kinase-kinase 7, MAP3K7), что приводит к активации киназного комплекса IKK (киназа IκB, англ. IκB kinase). Комплекс IKK, состоящий из двух каталитических субъединиц (IKKα, IKKβ) и одной регуляторной (IKKγ/NEMO), фосфорилирует IκBα по двум N-концевым остаткам серина, после чего они подвергаются убиквитинированию и протеосомальной деградации. Димеры NF-κB высвобождаются и перемещаются в ядро клетки, где они регулируют транскрипцию генов-мишеней. ALK5 – активин рецептор-подобная киназа 5 (англ. activin receptor-like kinase 5, другое название – TGF-β-рецептор I типа, англ. TGFβR-I – TGF-β-рецептор I); AMPK – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа (англ. AMP activated protein kinase) – клеточная протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки; JNK – c-Jun N-терминальная киназа (англ. c-Jun N-terminal kinase, другое название – связанная со стрессом протеинкиназа, англ. SAPK – stress-activated protein kinase); MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (англ. monocyte chemoattractant protein-1, другое название – CCL2, C-C motif ligand 2); MEK или MKK – другие названия MAPK kinase; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinases); NEMO – основной модулятор NF-κB (англ. NF-κB essential modulator). P указывает на фосфорилирование, Ub – убиквитинирование. См. текст для других сокращений.

и семейство miR-370 регулируются отрицательно. В процессе дифференцировки (на 18-й день культивирования) наблюдается активация нейрональных miRNAs, например, miR-124-5p и miR-9-5p, с последующей понижающей их регуляцией на 60-й день (Shahriari et al., 2020), что может отражать нейральное происхождение клеток РПЭ. Однако отнесение miR-124-5p к нейрональным miRNAs не согласуется с данными другой работы,

в которой показано участие miR-124 в поддержании клетками РПЭ эпителиального фенотипа (Jun, Joо, 2016).

В дифференцирующихся и терминально дифференцированных клетках РПЭ более половины miRNome РПЭ составляют miR-204, miR-211, miR-125b и семейство let-7 (Shahriari et al., 2020). Так, показано участие miR-125b-5p и let-7a-5p в передаче сигналов митоген-активируемой проте-

инкиназы (англ. mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Shahriari et al., 2020), избыточная активность которого приводит к ВМД, тогда как полное ингибирование пути MAPK вызывает гибель клеток сетчатки (Van Dijk et al., 2016). Эти наблюдения подчеркивают необходимость строгой регуляции MAPK и связанных путей в дифференцировке и поддержании клеток РПЭ.

MiR-204 и miR-211 имеют одну и ту же последовательность затравочной области и отличаются только двумя нуклеотидами в 3'-конце, они были классифицированы как одно семейство с одним и тем же набором прогнозируемых мишеней (TargetScan) (Lewis et al., 2005). Как показано в работе Аджанто и соавт. (Adijanto et al., 2012), miR-204/211 регулируют microphthalmia-associated transcription factor (MITF) и способствуют поддержанию эпителиального фенотипа в клетках РПЭ (см. табл. 1). Так, подавление экспрессии MITF приводило к потере фенотипа первичными фетальными клетками РПЭ человека, что предотвращалось сверхэкспрессией miR-204/211 (Adijanto et al., 2012). А Ванг и соавт. (Wang et al., 2010) показали, что прямыми мишенями miR-204 являются рецептор 2 трансформирующего фактора роста-бета (англ. transforming growth factor receptor type-2, TGF $\beta$ -II) и SNAI2 (SLUG). Снижение экспрессии miR-204 приводило к снижению экспрессии клаудинов 10, 16 и 19 в первичных фетальных клетках РПЭ человека, а использование анти-miR-204/211 – к снижению трансэпителиального сопротивления и проводимости апикальной мембраны. Последнее авторы объясняют тем, что мишенью miR-204 является белок калиевых каналов внутреннего выпрямления (англ. inward rectifying K<sup>+</sup>-channels, Kir) – Kir7.1, располагающийся на апикальной мембране клеток РПЭ (Wang et al., 2010). Как показали исследователи, анти-miR-204 снижает экспрессию Kir7.1 опосредовано, через активацию TGF $\beta$ -RII и передачу сигнала протеинкиназы C. Таким образом, miR-204 связывает TGF $\beta$ -RII и поддерживает гомеостаз калия. В целом, работы Ванга и соавт. (Wang et al., 2010), Аджанто и соавт. (Adijanto et al., 2012) и Ху и соавт. (Hu et al., 2012) указывают на критическую роль miR-204/211 в поддержании функции эпителиального барьера и физиологии клеток РПЭ. Как показано в этих работах, мишенями РПЭ-специфичных miRNAs являются как транскрипционные факторы, участвующие в дифференцировке РПЭ (Adijanto et al., 2012; Hu et al., 2012), так и рецепторы и регуляторные молекулы, расположенные ниже по течению TGF- $\beta$  сигнального пути, основного игрока ЭМП (Wang et al., 2010). В связи с этим предполагается, что терапевтические препараты на основе miR-204/211 могут быть эффективными средствами лечения заболеваний, которые включают дедифференцировку РПЭ, например, таких как ПВР.

Как показано, Чен и соавт. (Chen et al., 2014), при TGF- $\beta$ 2-индуцированном ЭМП в клетках РПЭ человека по-разному экспрессируется 304 miRNAs. Из этих дифференциально экспрессируемых miRNA, 185 miRNA были подавлены, а 119 miRNA были активированы по крайней мере в 2 раза в образцах, обработанных TGF- $\beta$ 2. Это важный шаг в идентификации miRNAs, связанных с прогрессированием ПВР и диабетической ретинопатии, и в идентификации потенциальных терапевтических мишеней для этих заболеваний. Результаты получили подтверждение в последующих работах (Jun, Joo, 2016; Li et al., 2016b; Deji et al., 2020). Так, в работе Дежи и соавт. (Deji et al., 2020) показано, что в обработанных TGF- $\beta$ 2 клетках ARPE-19 резко снижается экспрессия упомянутой выше miR-let7c и при этом активируется путь передачи сигнала NF- $\kappa$ B. Помимо miR-204/211 и семейства let7 ряд других miRNA, такие как miR-21 (Usui-Ouchi et al., 2016), miR-29b (Li et al., 2016b), miR-124 (Jun, Joo, 2016), miR-182 (Wang et al., 2016) и miR-194 (Cui et al., 2019), были признаны молекулярными регуляторами и потенциальными терапевтическими мишенями при ПВР. Например, Ли и соавт. (Li et al., 2016b) показали, что ингибирование miR-29b в клетках ARPE-19 напрямую запускало процесс ЭМП, который характеризовался фенотипическими изменениями, активацией альфа-гладкомышечного актина ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA), подавлением E-кадгерина и zonula occludens 1 (ZO-1) и повышенной миграцией клеток. Кроме того, авторы показали, что мишенью miR-29b был AKT2, участник неканонического TGF- $\beta$  сигнального пути, подавление которого ингибировало TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП. В работе Куи и соавт. (Cui et al., 2019) сверхэкспрессия miR-194 значительно ингибировала TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП клеток ARPE-19, при этом значительно снижалась экспрессия некоторых генов, которые регулируются zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1). Джун и Жу (Jun, Joo, 2016) на клетках ARPE-19 показали снижение уровня экспрессии miR-124 при прогрессировании ЭМП. Ингибирование эндогенного miR-124 способствовало увеличению мезенхимальных и снижению эпителиальных маркеров. Сверхэкспрессия miR-124 увеличивала уровни ZO-1 и окклюдина, подавляла уровни фибронектина,  $\alpha$ SMA и виментина, а также подавляла TGF- $\beta$ 1-индуцированное сокращение коллагенового геля клетками РПЭ. Кроме того, как выявлено в исследовании, мишенью miR-124 была мРНК Ras homology Growth-related (RHOG).

MiR-34a, как показали Хоу и соавт. (Hou et al., 2013), была подавлена в субконфлюэнтных по сравнению с постконфлюэнтными клетками ARPE-19. Авторы предполагают, что miR-34a ингибирует пролиферацию и миграцию клеток, поскольку она подавляла рецептор фактора роста гепатоци-

**Таблица 1.** Проявления в клетках РПЭ при регуляции экспрессии miRNA

miRNA	Мишень miRNA	Проявления в клетках РПЭ	Источник
Подавление экспрессии miRNA			
miR-204	TGFβ-RII, SNAI2 (SLUG), Kir7.1	Снижение экспрессии клаудинов 10, 16 и 19	(Wang et al., 2010)
miR-204/211	НД	Снижение экспрессии MITF	(Adijanto et al., 2012)
miR-let7c	НД	Активация NF-κB сигнального пути	(Deji et al., 2020)
miR-29b	АКТ2	ЭМП: активация αSMA, подавление E-кадгерина и ZO-1, повышение миграционной активности клеток ARPE-19	(Li et al., 2016b)
miR-124	RHO G	ЭМП: увеличение мезенхимальных и снижение эпителиальных маркеров в клетках ARPE-19	(Jun, Joo, 2016)
miR-34a	c-Met, CDK2, CDK4, CDK6, E2F1, p-Cdc2	Пролиферация и миграция клеток ARPE-19	(Hou et al., 2013)
miR-182	c-Met	Пролиферация и миграция первичных клеток РПЭ	(Wang et al., 2016)
miR-21	НД	Подавление пролиферации и миграции клеток ARPE-19	(Usui-Ouchi et al., 2016)
miR-184	EZR	Снижение уровня белка LAMP-1 в первичной культуре РПЭ человека (у пациентов с ВМД)	(Murad et al., 2014)
miR-23a	Fas	Увеличение апоптоза клеток ARPE-19	(Lin et al., 2011)
miR-23a	GLS1	Восстановление метаболизма глутамина, увеличение выживаемости клеток ARPE-19	(Li et al., 2016a)
Увеличение экспрессии miRNA			
miR-124	RHO G	Увеличение уровня ZO-1 и окклюдина, подавление уровней фибронектина, αSMA и виментина, подавление TGF-β1-индуцированного сокращения коллагенового геля клетками ARPE-19	(Jun, Joo, 2016)
miR-194	НД	Ингибирование TGF-β1-индуцированного ЭМП клеток ARPE-19, снижение экспрессии генов, регулируемых ZEB1	(Cui et al., 2019)
miR-93	TGFβR-II	Снижение секреции VEGF-A, ингибирование	(Fuchs et al., 2020)
miR-302d	TGFβR-II, Smad2 и Smad3	TGF-β-индуцированного ЭМП клеток ARPE-19	

НД – нет данных.

тов (англ. hepatocyte growth factor receptor) c-Met и другие молекулы, связанные с клеточным циклом, такие как циклин-зависимые киназы 2, 4 и 6 (англ. cyclin-dependent kinases 2, 4, 6; CDK2, CDK4, CDK6), фактор транскрипции E2F1 и фосфорилированный белок контроля клеточного деления (англ. phospho-cell division control protein, p-Cdc2). В подавлении c-Met участвует и еще одна miRNA – miR-182 (Wang et al., 2016). Так, показано, что трансфекция miR-182 в первичные клетки РПЭ индуцировала подавление c-Met и снижение образования p-AKT. Подавление c-Met в свою очередь приводило к снижению пролиферации и миграции клеток РПЭ. Исследователи полагают, что подавление miR-182 вместе с активацией c-Met в эпиретинальных мембранах играют

важную роль в развитии ПВР. В связи с чем, стратегия селективной активации экспрессии miR-182 в клинических условиях может представить новый вариант лечения этого заболевания.

Эксперименты Усуи-Оучи и соавт. (Usui-Ouchi et al., 2016) по усилению и потере функции, связанной с ангиогенезом и развитием фиброза, показали, что miR-21, в отличие от miR-34a и miR-182, наоборот способствует пролиферации и миграции клеток ARPE-19. При этом miR-21 не влияет на экспрессию генов, связанных с ЭМП. Моррис и соавт. (Morris et al., 2020), используя совместное культивирование первичных фетальных клеток РПЭ человека и микроглии сетчатки мыши, показали, что miR-21 переносится между двумя типами клеток. Кроме того, авторы показали, что

уровень внутриклеточного miR-21 был повышен в старом РПЭ, и это могло способствовать его увеличению в экзосомах и соответственно в микроглии. Повышенный уровень miR-21 в микроглии влиял на экспрессию генов ниже по ходу пути р53. Эти данные, по мнению авторов, предполагают, что опосредованный экзосомами перенос miRNA является сигнальным механизмом, который вносит вклад в регуляцию функции микроглии в стареющей сетчатке. Полученные данные согласуются с результатами работы Шахриари и соавт. (Shahriari et al., 2020), показавшими, что экспрессия hsa-miR-21-5p в течение дифференцировки РПЭ из ESCs значительно не меняется.

### РОЛЬ miRNA В ПАТОГЕНЕЗЕ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ

В ряде исследований показано, что miRNAs могут играть важную роль в патогенезе ВМД и пигментном ретините (Lin et al., 2011; Li et al., 2016a; Donato et al., 2018). Поскольку основным индуктором гибели и старения клеток РПЭ при ВМД и пигментном ретините считается окислительный стресс, большое количество работ посвящено выявлению изменений экспрессии miRNAs под влиянием окислителей. Так, Донато и соавт. (Donato et al., 2018) с помощью транскриптомного анализа первичных клеток РПЭ человека, обработанных окислителем, окисленного липопротеина низкой плотности, выявили изменения в экспрессии 23 miRNAs по сравнению с контролем. Изменения касались в том числе таких miRNAs, как hsa-miR-1307, hsa-miR-3064, hsa-miR-4709, hsa-miR-3615 и hsa-miR-637, нацеленных на гены (*KLHL7*, *RDH11*, *CERKL*, *AIP1*, *USH1G*), участвующие в различных биохимических процессах. Так, выявлено, что мишенью для hsa-miR-1307 является мРНК гена *KLHL7*, мутации которого могут определять изменения в убиквитинировании белков-мишеней для протеасом-опосредованной деградации; мишенью hsa-miR-3064 — *RDH11*, кодирующий фермент, необходимый для зрительного и системного метаболизма ретиноевой кислоты; мишенью hsa-miR-4709 — *CERKL*, кодирующий антиоксидантный белок, имеющий решающее значение для выживания фоторецепторов; мишенью hsa-miR-3615 — *AIP1*, мутации которого вызывают различные формы рецессивной ретинопатии и врожденного амавроза Лебера; а мишенью hsa-miR-637 — *USH1G*, один из наиболее известных причинных генов синдрома Ашера I типа (Donato et al., 2018).

Мурад и соавт. (Murad et al., 2014) с помощью протеомного анализа показали, что ген эзрина (*EZR*) является мишенью для miR-184 в РПЭ человека. В первичной культуре РПЭ человека, выделенного из глаз доноров с ВМД (РПЭ ВМД),

miR-184 была значительно подавлена по сравнению с контрольным (нормальным) РПЭ. Подавление miR-184 соответствовало значительно более низким уровням лизосомально-ассоциированного мембранного белка 1 (англ. lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1), необходимого для образования фагоцитарных вакуолей. Сверхэкспрессия miR-184 в РПЭ ВМД способствовала восстановлению экспрессии белка LAMP-1 до нормальных уровней. В целом, эти наблюдения свидетельствуют о важной роли miR-184 в жизнедеятельности РПЭ и поддерживают гипотезу, предполагающую, что подавление экспрессии miR-184 во время старения может приводить к нарушению регуляции функции РПЭ, способствуя дегенерации сетчатки (Murad et al., 2014).

В ряде случаев определение роли той или иной miRNA противоречивы. Так, Лин и соавт. (Lin et al., 2011) с помощью количественной ПЦР в реальном времени обнаружили подавление экспрессии miR-23a в клетках РПЭ из области макулы пациентов с ВМД. Кроме того, авторы показали, что miR-23a подавлялась в первичных клетках РПЭ и клетках линии ARPE-19 при более высокой дозе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Используя ингибитор miR-23a, авторы выявили увеличение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной смерти и апоптоза клеток ARPE-19, тогда как активация miR-23a защищала клетки ARPE-19 от окислительного повреждения (Lin et al., 2011). В то же время в другой работе показан противоположный эффект. Так, обработка клеток ARPE-19 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активировала miR-23a (Li et al., 2016a). В связи с этим авторы предположили, что ингибирование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной miR-23a будет защищать клетки РПЭ от гибели, вызванной окислительным стрессом. В то же время, как показано в работе Ху и соавт. (Hu et al., 2012), во время развития РПЭ из ESCs экспрессия miR-23a значительно увеличивается, свидетельствуя об участии miR-23a в поддержании здорового РПЭ. В качестве механизма, задействованного в защите клеток РПЭ от окислительного повреждения, Лин и соавт. (Lin et al., 2011) предположили участие miR-23a в регуляции апоптотического фактора Fas. Тогда как Ли и соавт. (Li et al., 2016a) показали, что прямой мишенью miR-23a в клетках РПЭ является глутаминаза 1 (англ. glutaminase 1, GLS1), которую подавляет H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GLS1 — митохондриальный фермент, который гидролизует глутамин в глутамат и способствует пролиферации клеток. По мнению Ли и соавт. (Li et al., 2016a), ингибирование miR-23a будет способствовать восстановлению метаболизма глутамин, поэтому miR-23a может быть новой терапевтической мишенью при дегенеративных заболеваниях сетчатки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обширные функции малых некодирующих РНК и возможность их локальной доставки в глаз требует пристального изучения, так как они могут быть полезны в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний. Однако, нужно отдавать себе отчет в том, что имеющиеся в настоящее время различия в результатах исследований нуждаются в уточнении и снятии противоречий. Тем не менее, очевидно, что дальнейшие исследования по дифференциально экспрессируемым miRNAs в сетчатке и РПЭ необходимо продолжить, поскольку это поможет как в идентификации биомаркеров пролиферативных и дегенеративных заболеваний сетчатки, так и в установлении потенциальных мишеней для терапии препаратами на основе miRNAs.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарность коллегам за помощь в подготовке статьи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН на 2021 год № 0088-2021-0017.

## 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 А.В. Кузнецова проводила анализ мировой литературы, участвовала в написании основного текста статьи и подготовке иллюстративного материала. Авторы Л.А. Ржанова и М.А. Александрова участвовали в редактировании и обсуждении текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ablonczy Z., Dahrouj M., Marneros A.G.* Progressive dysfunction of the retinal pigment epithelium and retina due to increased VEGF-A levels // *FASEB J.* 2014. V. 28. № 5. P. 2369–2379.
- Adijanto J., Castorino J.J., Wang Z.X. et al.* Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 24. P. 20491–20503.
- Ahmadzada T., Reid G., McKenzie D.R.* Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer // *Bio-phys. Rev.* 2018. V. 10. № 1. P. 69–86.
- Askou A.L., Aagaard L., Kostic C., et al.* Multigenic lentiviral vectors for combined and tissue-specific expression of miRNA- and protein-based antiangiogenic factors // *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* 2015. V. 2. P. 14064.
- Cabral T., Mello L.G.M., Lima L.H. et al.* Retinal and choro-oidal angiogenesis: a review of new targets // *Int. J. Retin. Vitr.* 2017. V. 3. № 1.
- Canal M., Romani-Aumedes J., Martín-Flores N. et al.* RTP801/REDD1: A stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. V. 8. № OCT.
- Chen C.W., Yeh M.K., Shiau C.Y. et al.* Efficient downregulation of VEGF in Retinal pigment epithelial cells by integrin ligand-labeled liposome-mediated siRNA delivery // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 2613–2627.
- Chen X., Ye S., Xiao W. et al.* Differentially expressed microRNAs in TGFβ2-induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *Int. J. Mol. Med.* 2014. V. 33. № 5. P. 1195–1200.
- Cottet S., Favez T., Maurer F. et al.* Targeted silencing of RPE65 in the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 using lentivirus-mediated siRNA delivery // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. № 13. P. 3054.
- Cui L., Lyu Y., Jin X. et al.* miR-194 suppresses epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by directly targeting ZEB1 // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. № 23. P. 751.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.90>
- Deji Q.Z., Yan F., Zhaba W.D. et al.* Cross-talk between microRNA-let7c and transforming growth factor-β2 during epithelial-to-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Ophthalmol.* 2020. V. 13. № 5. P. 693–700.
- Dijk E.H.C. Van, Duits D.E.M., Versluis M., et al.* Loss of MAPK pathway activation in post-mitotic retinal cells as mechanism in mek inhibition-related retinopathy in cancer patients // *Med. (United States).* 2016. V. 95. № 18. P. e3457.
- Donato L., Bramanti P., Scimone C. et al.* miRNA expression profile of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress conditions // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. № 2. P. 219–233.
- Ford K.M., Saint-Geniez M., Walshe T. et al.* Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. № 13. P. 9478–9487.
- Fuchs H.R., Meister R., Lotke R., Framme C.* The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFβ-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // *Exp. Eye Res.* 2020. V. 201.
- Garba A.O., Mousa S.A.* Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration // *Ophthalmol. Eye Dis.* 2010. V. 2. P. OED.S4878.
- Hou Q., Tang J., Wang Z. et al.* Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. V. 54. № 10. P. 6481–6488.

- Hu G., Huang K., Yu J. et al. Identification of miRNA signatures during the differentiation of hESCs into retinal pigment epithelial cells // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. P. e37224.
- Jun J.H., Joo C.K. MicroRNA-124 controls transforming growth factor  $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium by targeting RHO G // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 1. P. 12–20.
- Kaiser P.K., Symons R.C.A., Shah S.M. et al. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027 // Am. J. Ophthalmol. 2010. V. 150. № 1.
- Kaneko H., Terasaki H. Biological involvement of microRNAs in proliferative vitreoretinopathy // Transl. Vis. Sci. Technol. 2017. V. 6. № 4.
- Lam J.K.W., Chow M.Y.T., Zhang Y., Leung S.W.S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing // Mol. Ther. – Nucleic Acids. 2015. V. 4. № 9. P. e252.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // Cell. 2005. V. 120. № 1. P. 15–20.
- Li D. dan, Zhong B. wu, Zhang H. xia, et al. Inhibition of the oxidative stress-induced miR-23a protects the human retinal pigment epithelium (RPE) cells from apoptosis through the upregulation of glutaminase and glutamine uptake // Mol. Biol. Rep. 2016a. V. 43. № 10. P. 1079–1087.
- Li M., Li H., Liu X. et al. MicroRNA-29b regulates TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 // Exp. Cell Res. 2016b. V. 345. № 2. P. 115–124.
- Lin H., Qian J., Castillo A.C. et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. V. 52. № 9. P. 6308–6314.
- Luo X., Gu S., Zhang Y., Zhang J. Kinsenoside ameliorates oxidative stress-induced RPE cell apoptosis and inhibits angiogenesis via Erk/p38/NF- $\kappa$ B/VEGF signaling // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. № 240.
- Morris D.R., Bounds S.E., Liu H. et al. Exosomal miRNA transfer between retinal microglia and RPE // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 10.
- Murad N., Kokkinaki M., Gunawardena N. et al. MiR-184 regulates ezrin, LAMP-1 expression, affects phagocytosis in human retinal pigment epithelium and is downregulated in age-related macular degeneration // FEBS J. 2014. V. 281. № 23. P. 5251–5264.
- Nishijima K., Ng Y.S., Zhong L. et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury // Am. J. Pathol. 2007. V. 171. № 1. P. 53–67.
- Saint-Geniez M., Maharaj A.S.R., Walshe T.E. et al. Endogenous VEGF is required for visual function: Evidence for a survival role on Müller cells and photoreceptors // PLoS One. 2008. V. 3. № 11.
- Saw P.E., Song E.W. siRNA therapeutics: a clinical reality // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. № 4. P. 485–500.
- Shahriari F., Satarian L., Moradi S. et al. MicroRNA profiling reveals important functions of miR-125b and let-7a during human retinal pigment epithelial cell differentiation // Exp. Eye Res. 2020. V. 190. P. 107883.
- Shoshani T., Faerman A., Mett I. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. № 7. P. 2283–2293.
- Sundermeier T.R., Palczewski K. The impact of microRNA gene regulation on the survival and function of mature cell types in the eye // FASEB J. 2016. V. 30. № 1. P. 23–33.
- Terasaki H., Kase S., Shirasawa M. et al. TNF- $\alpha$  decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- $\kappa$ B pathways // PLoS One. 2013. V. 8. № 7.
- Usui-Ouchi A., Ouchi Y., Kiyokawa M. et al. Upregulation of mir-21 levels in the vitreous humor is associated with development of proliferative vitreoretinal disease // PLoS One. 2016. V. 11. № 6.
- Wang F.E., Zhang C., Maminishkis A. et al. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology // FASEB J. 2010. V. 24. № 5. P. 1552–1571.
- Wang L., Dong F., Reinach P.S., et al. MicroRNA-182 suppresses HGF/SF-induced increases in retinal pigment epithelial cell proliferation and migration through targeting C-met // PLoS One. 2016. V. 11. № 12.
- Yang L., Liu Z., Gong H. et al. Efficient delivery of NF- $\kappa$ B siRNA to human retinal pigment epithelial cells with hyperbranched cationic polysaccharide derivative-based nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. 2015. V. 10. № 1. P. 2735.
- Yoshida T., Mett I., Bhunia A.K. et al. Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke-induced pulmonary injury and emphysema // Nat. Med. 2010. V. 16. № 7. P. 767–773.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang W.H. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential // Cell Biosci. 2019. V. 9. № 1. P. 1–18.

## Small Non-Coding RNA in Regulation of Differentiation of Retinal Pigment Epithelium

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

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

\*e-mail: avkuzn@list.ru

Dedifferentiation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (RPE) cells, as well as the participation of cells in neovascularization of the retina and choroid, underlie the devel-

opment of various ophthalmic diseases that lead to serious loss of vision. Understanding the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of RPE cell differentiation, as well as elucidating the role of RPE cells in eye angiogenesis, will help identify new therapeutic targets for the treatment of ophthalmopathy. The discovery that small non-coding RNAs – small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) – are involved in gene regulation has prompted research to investigate the role of siRNAs in inhibiting gene expression in RPE cells involved in ocular angiogenesis, as well as identifying the role of miRNAs in the regulation of differentiation and EMT of RPE cells. The ability to locally deliver small non-coding RNAs directly to the eye could be useful as new classes of therapeutic agents for the treatment of a wide range of ophthalmic diseases.

*Keywords:* retinal pigment epithelium, RPE, siRNA, miRNA, epithelial-mesenchymal transition, EMT, angiogenesis, VEGF, choroidal neovascularization, neovascular eye diseases, vitreoretinal diseases, age-related macular degeneration