СОДЕРЖАНИЕ

Том 51, номер 3, 2020

Contents

Vol. 51, No. 3, 2020

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 163–176

ОБЗОРЫ

УДК 576.367

ПРОГРАММИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА И СЕМЕНИ

© 2020 г. Т. В. Доронина[a], *, Е. В. Шеваль[a, b], Е. М. Лазарева[a]

[a]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

[b]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские Горы, 1, стр. 40, Москва, 119234 Россия

*e-mail: matveevatatiana.94@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.06.2019 г.
После доработки 16.01.2020 г.
Принята к публикации 20.01.2020 г.

Программируемая клеточная гибель вовлечена в реализацию программы онтогенеза любого растения. При формировании и созревании тканей семени программируемая клеточная гибель является ключевым фактором элиминации клеток, позволяющим развиваться новым структурам. В обзоре обсуждаются данные о морфологических и биохимических особенностях программируемой клеточной гибели в ходе онтогенеза зародышевого мешка и семени.

Ключевые слова: программируемая клеточная гибель, растения, зародышевый мешок, семя, морфогенез

DOI: 10.31857/S0475145020030027

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в процессах формирования и обновления тканей многоклеточных организмов, ответе на проникновение патогенов и стрессорные воздействия и т.п. играют процессы программируемой клеточной гибели (ПКГ). ПКГ, обеспечивая элиминацию клеток и тканей, выполнивших свою функцию, является ключевым инструментом многих морфогенезов. У растений значимую роль ПКГ играет при формировании зародышевого мешка и семени. В ходе развития семени происходит большое количество перестроек тканей, при этом часть клеток элиминируется, что обеспечивается ПКГ. Погибает часть образовавшихся при мейозе мегаспор, при оплодотворении происходит гибель синергид, до или вскоре после оплодотворения погибают антиподальные клетки. В процессе развития семени погибает часть клеток подвеска, нуцеллуса, эндосперма и интегументов (Van Hautegem et al., 2015; Hunt, McCabe, 2017). Без ПКГ невозможно правильное формирование тканей полноценного зародышевого мешка и семени у всех без исключения покрытосеменных растений. Семя необходимо любому растению для размножения, расселения, а, следовательно, и для сохранения биологических видов растений.

У растений, как и у животных, выявлены различные типы ПКГ (Van Doorn et al., 2011), однако биохимические механизмы, лежащие в их основе, и связанные с ними морфологические изменения клеток и тканей изучены слабо. В отличие от аналогичных обзоров (Van Hautegem et al., 2015), где сделан акцент на молекулярных аспектах ПКГ, данный обзор является попыткой систематизировать и морфологические особенности гибели клеток тканей женского гаметофита (зародышевого мешка) и формирующегося семени, и молекулярные механизмы регуляции этих процессов.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПКГ РАСТЕНИЙ

Если классификация ПКГ у животных постоянно пересматривается и уточняется (Galluzzi et al., 2018), то общепринятой классификации ПКГ растений в настоящее время не существует. Варианты ПКГ у растений могут быть классифицированы на основании причин, которые их вызывают. Первый вариант – ПКГ при дифференцировке тканей и процессе старения (developmental-induced programmed cell death (dPCD)) ПКГ необходима для правильного формирования половины важнейших тканей растений – ксилемы, феллемы, отчасти флоэмы, склеренхимы, нуцеллуса, тапетума,

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПКГ – программируемая клеточная гибель; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

подвеска, интегументов и др. (Daneva et al., 2016). Второй вариант – ПКГ, индуцируемая действием различных стрессовых факторов (environmental-induced programmed cell death (ePCD)) (Maizel, 2015). В результате анализа транскриптомов растений было показано, что в случае dPCD или ePCD экспрессируются разные гены (Olvera-Carrillo et al., 2015), следовательно, эти варианты ПКГ имеют существенные различия в молекулярных механизмах протекания.

В 2011 году было предложено выделять два варианта ПКГ у растений – “вакуолярную клеточную гибель” и “программируемый некроз” (Van Doorn et al., 2011). Эти виды клеточной смерти были выделены на основании их морфологии, в отличие от вышеописанной функциональной классификации. В первую группу попали варианты ПКГ, при которых наблюдался лизис клетки вследствие разрыва тонопласта, во вторую группу – варианты, где лизиса не наблюдалось (рис. 1). Позднее Van Doorn назвал эти варианты “автолитической” и “неавтолитической” гибелью (Van Doorn, 2011). Некоторые варианты сочетают в себе черты “автолитической” и “неавтолитической” гибели (Van Doorn et al., 2011).

Частью физиологических процессов здорового организма у растений, как и у животных, является формирование аутофагосом для селективной деградации органелл. Аутофагосомы формируются и в ходе вакуолярной клеточной гибели у растений (Üstün et al., 2017; Wang et al., 2018). Была описана митофагия – деградация митохондрий; хлорофагия – деградация хлоропластов или частей хлоропластов (РУБИСКО – рибулозобисфосфаткарбоксилаза-содержащих телец); пексофагия – деградация пероксисом; ретикулофагия – деградация фрагментов эндоплазматического ретикулума (ЭПР); протеафагия – деградация протеасом, агрефагия – деградация убиквитинированных агрегатов белков и ксенофагия – деградация вирусных частиц (Üstün et al., 2017). При макроаутофагии происходит формирование мембраны аутофагосомы, которая окружает клеточный материал, обреченный на деградацию. Предполагается, источником мембран для аутофагосом является ЭПР (Zhuang et al., 2017). Аутофагосома траспортируется к литической вакуоли и сливается с ней, и там происходит окончательная деградация клеточного материала (Hofius et al., 2011). Как и у животных, у растений в регуляцию аутофагии вовлечены *ATG*-гены (autophagy-related genes) (Hofius et al., 2011). При индукции вакуолярной клеточной гибели происходит формирование большого количества аутофагосом, впоследствии сливающихся с вакуолью (Minina et al., 2013). На финальных этапах происходит разрыв тонопласта и деградация всего протопласта с органеллами, а иногда и клеточной стенки (Van Doorn et al., 2011). Необходимо отметить, что у животных аутофагия выделена в отдельный вид клеточной гибели (Galluzzi et al., 2018). Некоторые авторы называют вакуолярную клеточную гибель у растений аутофагической. Термин “вакуолярная клеточная гибель” употребляется значительно чаще, чем “аутофагическая гибель”, однако нельзя исключить, что этот вариант гибели (или какая-то часть случаев, относимых сейчас к этому варианту ПКГ) являются аналогом аутофагической гибели у животных.

При неавтолитической клеточной гибели (“программируемом некрозе” по классификации Van Doorn (Van Doorn et al., 2011)) плазматическая мембрана разрывается и отходит от клеточной стенки, протопласт сжимается (Reape, McCabe, 2008; Kacprzyk et al., 2011). При этом происходит значительная конденсация хроматина, фрагментация ДНК, расширение цистерн ЭПР и выход цитохрома *c* из митохондрий (Reape, McCabe, 2008). Reape и McCabe выступили с критикой предложенного Van Doorn термина “программируемый некроз”. По их мнению, некроз кроме разрыва мембран сопровождается набуханием органелл и клетки, вакуолизацией цитоплазмы, а вариант гибели, описанный Van Doorn, характеризуется, напротив, сжатием протопласта и его отхождением от клеточной стенки, а также выходом цитохрома с из митохондрий, что роднит этот тип гибели с апоптозом. Поэтому ими был предложен термин “апоптоз-подобная гибель” вместо термина “программируемый некроз” (Reape, McCabe, 2013).

Общепринятой классификации ПКГ растений в настоящее время не создано. В этой ситуации многие авторы даже не пытаются отнести конкретные варианты к определенному типу ПКГ, ограничиваясь описанием и анализом происходящих морфологических и биохимических событий.

ФОРМИРОВАНИЕ ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА И СЕМЕНИ

Морфология клеток при формировании зародышевого мешка изучена очень подробно (Johri et al., 2013). Описаны несколько типов развития зародышевого мешка, наиболее распространено развитие по типу *Polygonum* (рис. 2а). Так развиваются, например, зародышевые мешки злаков и *Arabidopsis*. В результате мейотического деления мегаспороцита формируются четыре мегаспоры, три из которых погибают, а оставшаяся мегаспора делится митотически, формируя ценоцит зародышевого мешка, содержащий восемь ядер. После целлюляризации формируются семь клеток: яйцеклетка и две синергиды, составляющие яйцевой аппарат, три антиподальные клетки и двуядерная центральная клетка (Yadegaria, Drews, 2004).

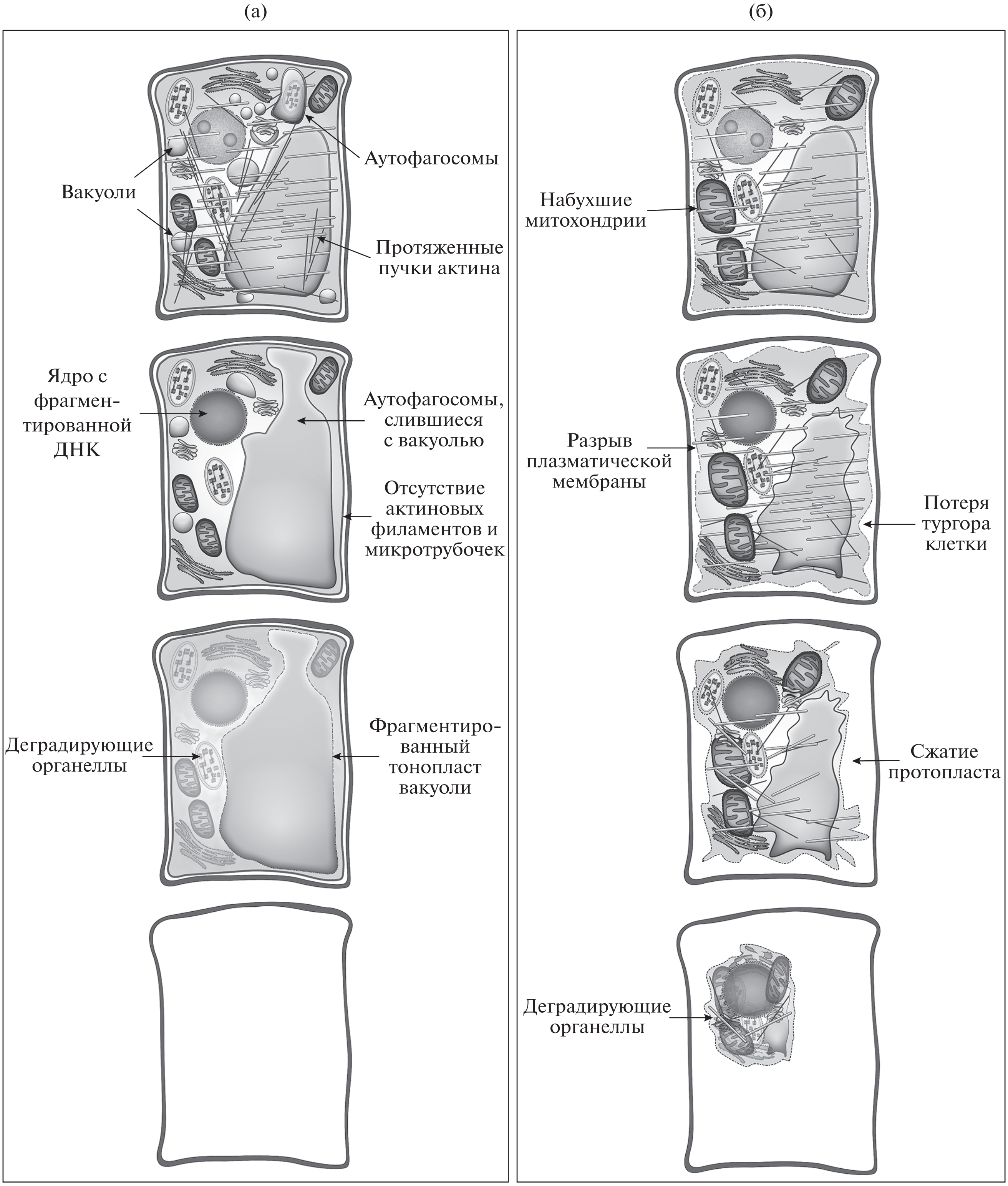

Рис. 1. Строение клеток растений в процессе программируемой клеточной гибели. (а) – вакуолярная клеточная гибель (Van Doorn et al., 2011) или автолитическая клеточная гибель (Van Doorn, 2011). В клетках наблюдается интенсивная вакуолизация цитоплазмы, формирование аутофагосом, сливающихся с литической вакуолью, формирование длинных тяжей актиновых филаментов. Затем микротрубочки и актиновые филаменты деполимеризуются, происходит фрагментация ДНК, разрыв тонопласта вакуоли приводит к деградации органелл. (б) – программируемый некроз (Van Doorn et al., 2011), или неавтолитическая клеточная гибель (Van Doorn, 2011), или апоптоз-подобная гибель (Reape, McCabe, 2013). В клетках происходит набухание митохондрий, разрыв плазматической мембраны, фрагментация ДНК. Клетка теряет тургор, протопласт отходит от клеточной стенки и сжимается, органеллы деградируют.

В ходе оплодотворения содержимое пыльцевой трубки, внутри которой находится два спермия, попадает в зародышевый мешок (Hamamura et al., 2012). Один из спермиев сливается с ядром яйцеклетки, другой – с ядром центральной клетки. В результате делений зиготы формируется зародыш, в результате деления оплодотворенной центральной клетки – эндосперм (рис. 2б). Таким образом, после оплодотворения семязачаток содержит ткани различной плоидности – диплоидный зародыш, интегументы, нуцеллус, триплоидный эндосперм и иногда (например, у злаков) гаплоидные антиподальные клетки (рис. 2в).

Хорошо изучено строение тканей семяпочки у *Arabidopsis* и злаков (рис. 3). При делении зиготы одна из клеток дает начало зародышу, другая – подвеску. Подвесок выполняет трофическую функцию, и связывает зародыш с тканями формирующегося семени (Peng, Sun, 2018). Зародыш в развитии проходит несколько стадий. Данные о дифференцировке ценоцита эндосперма у злаков и *Arabidopsis* обобщены в обзоре Olsen (Olsen, 2004). После двойного оплодотворения ядро первичной клетки эндосперма ядра злаков (рис. 3б) делится без цитокинеза, затем начинается процесс целлюляризации. Позднее в части клеток многослойного эндосперма накапливаются крахмальные зерна, другие клетки дифференцируются в алейроновый слой. У *Arabidopsis* (рис. 3а) ценоцитный эндосперм также претерпевает процесс целлюляризации, впоследствии большая часть эндосперма абсорбируется растущим зародышем и сохраняется три области – однослойная периферическая область, область, окружающая зародыш, и халазальная область (Olsen, 2004; Locascio et al., 2014).

ГИБЕЛЬ МЕГАСПОР

При развитии восьмиядерного двухполюсного зародышевого мешка в микропилярной области нуцеллуса выделяется мегаспороцит, из которого в результате мейоза формируются четыре мегаспоры. Три из четырех мегаспор погибают, оставшаяся дает начало клеткам зародышевого мешка (Yadegaria, Drews, 2004).

ПКГ нефункциональных мегаспор *Zea mays* сопровождается агрегацией гетерохроматина на периферии ядра, отхождением плазмалеммы от клеточной стенки, образованием вакуолей, сливающихся с плазмалеммой (Russell, 1979). Позднее разрушается плазмалемма, ядерная оболочка и тонопласт. Перед окончательной деградацией в цитоплазме выявляются липидные тела и осмиофильные массы (Russell, 1979). При гибели мегаспор *Tillandsia aeranthos* и *Tillandsia meridionalis* происходит формирование аутофагосом и значительная вакуолизация цитоплазмы, в ядре выявляются многочисленные блоки гетерохроматина, происходит фрагментация ДНК, выявляемая методом TUNEL, ЭПР набухает, в цитоплазме присутствуют липидные тела (Papini et al., 2011). По мнению авторов, клеточная гибель мегаспор у *Tillandsia* сочетает в себе признаки аутофагической (формирование большого количества вакуолей и аутофагосом), некротической (набухание эндоплазматического ретикулума) и апоптотической (фрагментация ДНК) (Papini et al., 2011).

Мало изучены причины, определяющие судьбу мегаспор. Имеются косвенные гистохимические данные об участии Ca^{2+} в регуляции гибели нефункциональных мегаспор *Lactuca sativa* (Qiu et al., 2008). В клеточных стенках гибнущих мегаспор *Zea mays*, *Tillandsia*, *Arabidopsis* при выборе функциональной мегаспоры каллозная оболочка вокруг нее растворяется в первую очередь и дольше сохраняется у нефункциональных мегаспор (Russell, 1979; Papini et al., 2011; Demesa-Arevalo, Vielle-Calzada, 2013). Предполагается, что арабиногалактанный белок AGP18 (arabinogalactan protein) *Arabidopsis* может определять судьбу мегаспор, т.к. повышение экспрессии гена *AGP18* в трансформированных растениях ведет к выживанию всех четырех мегаспор (Cao et al., 2018). Кроме того, на экспрессирующих ICK4-YFP растениях *Arabidopsis* было показано, что в дегенерирующих мегаспорах выявляется ингибитор циклинзависимых киназ ICK4/KRP (inhibitor of cyclin kinases/Kip-related proteins), который отсутствует в функциональной мегаспоре, давая ей развиваться дальше (Demesa-Arevalo, Vielle-Calzada, 2013). В настоящее время не получено данных об участии протеаз и гормонов в ПКГ мегаспор.

ПКГ избыточных мегаспор позволяет направить все ресурсы растения на поддержание жизнедеятельности одной мегаспоры, которая впоследствии сформирует зародышевый мешок.

ГИБЕЛЬ СИНЕРГИД

Синергиды погибают в ходе двойного оплодотворения. Между синергидами и пыльцевой трубкой существуют сложные молекулярные взаимодействия. Синергиды выделяют аттрактанты для пыльцевой трубки и определяют необходимое направление роста пыльцевой трубки (Higashiyama, Takeuchi 2015; Dresselhaus et al., 2016). В свою очередь, наличие пыльцевой трубки вызывает гибель синергид. У разных видов растений гибель рецептивной синергиды наступает в разное время. У многих видов растений гибель синергиды наступает без контакта с пыльцевой трубкой (Christensen et al., 1997). У *Arabidopsis thaliana* гибель синергиды происходит после того, как пыльцевая трубка достигла зародышевого мешка и вступила в контакт с синергидой (Leydon et al., 2015). При отсутствии пыльцевой трубки гибель синергид *Arabidopsis* не наступает (Christensen et al., 1997).

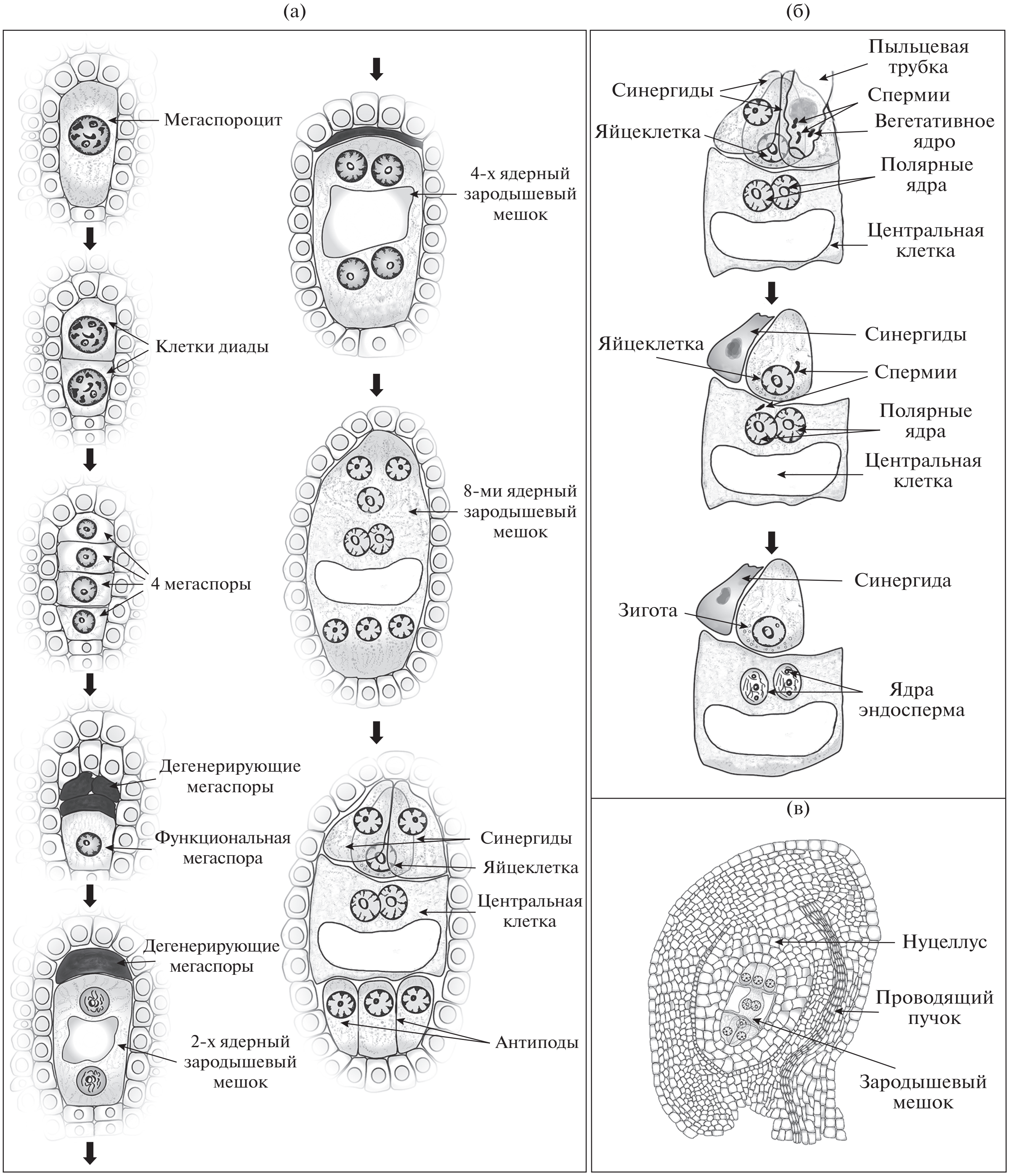

Рис. 2. Начальные этапы эмбриогенеза семени у *Arabidopsis thaliana* и злаков. (а) – этапы формирования зародышевого мешка. Мегаспороцит делится мейотически, из образовавшихся четырех мегаспор три гибнут. Оставшаяся мегаспора в результате митотических делений дает начало восьми ядрам зародышевого мешка. В ходе целлюляризации формируется семь клеток – яйцеклетка, две синергиды, центральная клетка с двумя полярными ядрами и три антиподальные клетки. (б) – двойное оплодотворение. Пыльцевая трубка подходит к синергиде. Один из спермиев сливается с яйцеклеткой, давая начало зиготе, а другой – с центральной клеткой зародышевого мешка, формируя эндосперм. (в) – схема строения семяпочки.

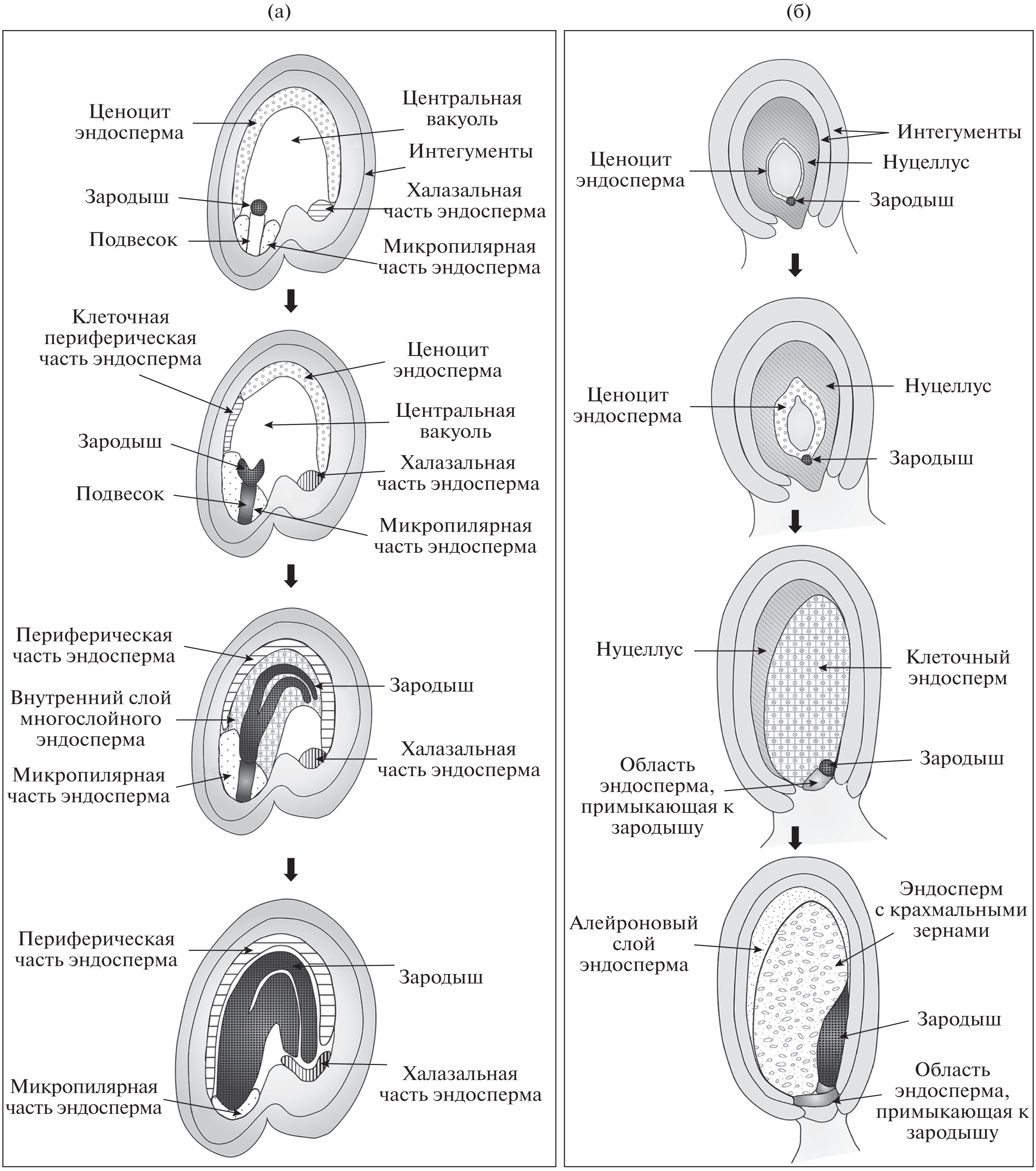

Рис. 3. Развитие семени *Arabidopsis thaliana* и *Zea mays*. На схеме представлены последовательные стадии дифференцировки тканей формирующегося семени. (а) – формирование семени *Arabidopsis thaliana*. По мере роста зародыша большая часть эндосперма подвергается ПКГ и абсорбируется, остаются три области – периферическая, микропилярная и халазальная. (б) – формирование семени *Zea mays*. В процессе развития семени эндосперм разрастается и дифференцируется на центральную область и алейроновый слой. Позднее, при прорастании, клетки алейронового слоя эндосперма выделяют гидролазы, которые делают вещества крахмального эндосперма доступными для зародыша.

После слияния спермия и яйцеклетки начинается дегенерация второй синергиды.

Описаны различные морфологические картины, сопровождающие ПКГ у синергид: вакуолизация цитоплазмы у *Nicotiana tabacum* (Tian, Russell, 1997), разрыв вакуоли у *Proboscidea louisianica* (Mogensenl, 1978), *Penniseturn glaueum* (Chaubal, Reger, 1993), *Nicotiana tabacum* (Huang, Russell, 1994), *Helleborus bocconei* (Bartoli et al., 2017), деформация ядра, конденсация хроматина у *Triticum aestivum* (An, You, 2004), фрагментация ДНК (TUNEL-позитивная реакция ядер) *Helleborus bocconei* (Bartoli et al., 2017). В ходе ПКГ синергид *Torenia fournieri* и *Nicotiana tabacum* агрегаты актина выявлялись в виде электронно-плотных комплексов, называемых “коронами”, в области деградирующей синергиды (Huang, Russell, 1994; Fu et al., 2000). Один из агрегатов актина был локализован со стороны яйцеклетки, другой располагался на халазальном конце денегерирующей синергиды. Авторы предполагают, что актиновые “короны” определяют место вхождения спермиев в яйцеклетку (Huang, Russell, 1994).

В цитоплазме гибнущих синергид *Triticum aestivum* и *Penniseturn glaueum* (Chaubal, Reger, 1992a, 1992b; Chaubal, Reger, 1993), *Nicotiana tabacum* (Tian, Russell, 1997), *Arabidopsis* (Ngo et al., 2014) выявлено повышение содержания Ca^{2+}. Остановка роста пыльцевой трубки и разрыв ее кончика у *Arabidopsis* регулируется кальций-опосредованным сигнальным путем, контролируемым киназой FERONIA, что было показано на мутантных растениях по гену *FER* (Kessler et al., 2010). Предполагается, что FERONIA и трансмембранный белок NORTIA кроме проникновения пыльцевой трубки контролируют и клеточную гибель синергид (Kessler et al., 2010). Арабиногалактанный белок 4 AGP4 (arabinogalactan protein), JAGGER, предотвращает прорастание множественных пыльцевых трубок у *Arabidopsis thaliana* и может быть вовлечен в регуляцию гибели синергид, т.к. у нокаутных мутантов по гену *AGP4*, кодирующему белок JAGGER синергиды выживают (Pereira et al., 2016). ПКГ синергид *Arabidopsis* сопровождается активацией белка J-domain-containing protein GFA2, выполняющего роль шаперона в матриксе митохондрий (Christensen, 2002). Показано, что после оплодотворения запускается этилен-зависимый сигнальный путь, регулируемый транскрипционными факторами EIN3 и EIN2 (ethylene insensitive) и необходимый для ПКГ синергид у *Arabidopsis*. Инъекция эндогенного предшественника этилена (ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) вызывает преждевременную гибель синергид (Völz et al., 2013). Данных об участии протеаз в ПКГ синергид нет.

ГИБЕЛЬ АНТИПОД

У большинства видов растений антиподы существуют недолго и дегенерируют вскоре после оплодотворения. До оплодотворения дегенерируют все три антиподальные клетки у *Arabidopsis thaliana* (Yadegaria, Drews, 2004). Антиподальные клетки злаков многократно делятся и образуют многоклеточную эфемерную ткань до оплодотворения. Для некоторых видов растений, особенно злаков, характерно формирование политенных хромосом в ядрах антиподальных клеток (Zhimulev, 1996). Точные функции антипод не ясны, но, поскольку при нарушении развития антипод эндосперм формируется неправильно, предполагается, что у злаков они могут выполнять трофическую и защитную функцию, обеспечивая эндосперм необходимыми веществами на неклеточной стадии развития (Engell, 1994; Chaban et al., 2011; Доронина, 2019).

Морфология антиподальных клеток злаков при ПКГ мало изучена. Так, у *Hordeum vulgare* и *Orysa sativa* при гибели ядерная мембрана формирует инвагинации, хроматин агрегирует (Engell, 1994; Maeda, Miyake, 1996). У гибнущих антипод пшеницы наблюдается уплотнение хроматина, уплощение ядер, разрывы в ДНК, выявляемые методом TUNEL (Chaban et al., 2011). Предполагается, что индуктором ПКГ антиподальных клеток злаков является целлюляризация ценоцита эндосперма (Chaban et al., 2011). Однако в современной литературе отсутствуют какие-либо биохимические характеристики ПКГ антиподальных клеток злаков.

Выяснены некоторые аспекты регуляции гибели антиподальных клеток *Arabidopsis*, которые погибают до опыления (Heydlauff, Groß-Hardt, 2014). Показано, что у нокаутных мутантов по генам факторов факторов сплайсинга м-РНК LACHESIS, CLOTHO и ATROPOS антиподальные клетки *Arabidopsis* локализованы в центре зародышевого мешка, их мембраны и ядра объединены, образовавшаяся клетка сходна с центральной клеткой (Heydlauff, Groß-Hardt, 2014). Предполагается, что белок GCD1 (GAMETE CELL DEFECTIVE 1) и тРНК-синтаза SYCO ARATH (кодируемая геном *FIONA*) митохондрий центральной клетки способствуют созреванию яйцеклетки и гибели антипод, т.к. у мутантов по генам *FIONA* и *GCD1* антиподальные клетки выживают (Kagi et al., 2010). Экспрессия митохондриального белка aac2A199D в яйцеклетке вызывает гибель антипод, а его экспрессия в центральной клетке предотвращает их гибель (Wu et al., 2012). Показано, что у трасгенных растений *Arabidopsis* с повышенной экспрессией гена биосинтеза ауксина *YUC* ПКГ антиподальных клеток не наступает. Поэтому предполагается, что синтез ауксинов препятствует гибели антиподальных клеток у *Ara-*

bidopsis (Pagnussat et al., 2009). До сих пор не показано участие протеаз в ПКГ антипод.

ГИБЕЛЬ ПОДВЕСКА

Подвесок – специализированная структура, удерживающая зародыш в семени и участвующая в поддержании его жизнедеятельности, обеспечивая питательными и ростовыми веществами (Kawashima, Goldberg, 2010). В ядрах клеток подвеска *Phaseolus* формируются политенные хромосомы, что свидетельствует об их высоком уровне метаболической активности (D'Amato, 2011).

Гибель клеток подвеска у голосеменных растений изучалась у *Picea abies* (Filonova et al., 2000; Smertenko et al., 2003; Bozhkov et al., 2005; Minina et al., 2013). Показано, что она сопровождается фрагментацией ДНК (Filonova et al., 2000; Bozhkov et al., 2005). В ходе ПКГ в цитоплазме выявляются короткие пучки микротрубочек и агрегаты тубулина, которые впоследствии деградируют, микрофиламенты формируют толстые протяженные пучки (Smertenko et al., 2003), было показано формирование аутофагосом (Minina et al., 2013). В процесс ПКГ подвеска у *Picea abies* вовлечена протеаза, активность которой выявляется по расщеплению модельного пептида Val-Glu-Ile-Asp (VEIDase activity), а также метакаспаза mcII-Pa, которая выявлена в цитоплазме и ядрах, содержащих разрывы ДНК (Bozhkov et al., 2005). Предполагается, что при гибели подвеска *Picea abies* mcII-Pa транспортируется в ядро и участвует в деградации ДНК. Активация метакаспазы mcII-Pa *Picea abies* ведет к активации аутофагии и *ATG*-генов, при этом формируются многочисленные аутофагосомы, впоследствии сливающиеся с вакуолью. В трасформированных растениях с подавленными генами *mcII-Pa* или *ATG5* и *ATG6*, гибель происходит по механизму некроза (Minina et al., 2013).

В ходе ПКГ хроматин ядер клеток подвеска у *Phaseolus* и *Tropaeolum* пикнотизируется (Nagl, 1974), ядро теряет округлую форму, может происходить разрушение ядерной оболочки (Zhao et al., 2013). С использованием метода TUNEL была детектирована фрагментация ДНК при гибели клеток подвеска *Zea mays* (Giuliani et al., 2002), *Vicia faba* (Wredle et al., 2001), *Phaseolus coccineus* (Lombardi et al., 2007), *Nicotiana tabacum* (Zhao et al., 2013), *Chenopodium quinoa* (López-Fernández, Maldonado, 2013). У *Chenopodium quinoa* в ходе гибели клеток подвеска принимают участие рициносомы – специфические микротельца, которые происходят от ЭПР и содержат протеазу CysEP (Greenwood et al., 2005; López-Fernández, Maldonado, 2013). В клетках подвеска *Phaseolus* и *Tropaeolum* (Nagl, 1977; Gartner, Nagl, 1980), *Vicia faba* (Giuliani et al., 2002), *Nicotiana tabacum* (Zhao et al., 2013) в ходе ПКГ формируются аутофагосомы, сливающиеся с вакуолью. На финальных этапах происходит разрыв тонопласта вакуоли и деградация органелл.

В ходе гибели подвеска *Nicotiana tabacum* активируются катепсин-подобные протеазы, а также протеазы с субстратной специфичностью каспаз 1, 3 и 6, что было показано на основании расщепления ими синтетических пептидных субстратов (Zhao et al., 2013). ПКГ подвеска табака *Nicotiana tabacum* зависит от взаимодействия двух белков – цистатина NtCYS, являющегося ингибитором протеаз и его мишени, катепсин H-подобной протеазы NtCP14. NtCYS экспрессируется в подвеске вплоть до достижения зародышем стадии 32 клеток, после чего происходит активация катепсин H-подобной протеазы NtCP14 и наступает ПКГ (Zhao et al., 2013). Предполагается, что индуктором ПКГ клеток подвеска служат клетки растущего зародыша. Показано, что у мутантов по генам, регулирующим развитие *Zea mays* с неразвитым зародышем, но нормальным эндоспермом гибель клеток подвеска не наступает (Consonni et al., 2003). В пользу гипотезы о том, что индуктором ПКГ подвеска является зародыш, также свидетельствуют наблюдения о том, что у *Phaseolus* и *Tropaeolum* первыми погибают клетки базальной части подвеска, которые располагаются в непосредственной близости к зародышу (Nagl, 1974). Предполагается, что лизированный материал подвеска может использоваться клетками зародыша (Nagl, 1974).

Гибель клеток подвеска наступает после выполнения им своих функций, когда разросшийся зародыш уже заякорен в семяпочке.

ГИБЕЛЬ КЛЕТОК НУЦЕЛЛУСА

Нуцеллус – это мегаспорангий семенных растений, главная задача которого – образование мегаспор. У некоторых растений, например, у злаков и киноа, он опосредованно выполняет покровную и защитную функции. Не у всех растений нуцеллус разрушается целиком, например, у кувшинки и гречихи из него формируется перисперм, запасающая ткань, которая компенсирует слабое развитие эндосперма (Lu, Magnani, 2018).

Клеточная гибель большинства клеток нуцеллуса у *Pinus densiflora* сопровождается конденсацией хроматина, фрагментацией ДНК, сжатием протопласта, отошедшего от клеточной стенки, оставшиеся клетки образуют нуцеллярный колпачок (Hiratsuka et al., 2002).

У *Arabidopsis* гибнущие дистальные клетки нуцеллуса имеют разрушенную мембрану и сжатые протопласты, в клетках проксимальной области наблюдается накопление аутофагосом (Xu et al., 2016). При ПКГ нуцеллуса пшеницы *Triticum aestivum* (Dominguez et al., 2001) происходит фрагментация ДНК, выявляемая методом TUNEL. При этом увеличивается содержание гетерохроматина в ядре, внешняя ядерная мембрана фрагментируется. В цитоплазме выявляются многочисленные вакуоли с нарушенным тонопластом. Плотность матрикса митохондрий увеличивается, в матриксе наблюдаются агрегаты электронноплотного материала, которые, по мнению авторов являются результатом деградации липидов внутренней мембраны. Цистерны ЭПР расширены, диктиосомы аппарата Гольджи долго сохраняют свою интактную структуру (Dominguez et al., 2001).

Lombardi с соавторами выделяли три области ассиметричного нуцеллуса у *Sechium edule* – проксимальную часть, непосредственно окружающую эндосперм, субдистальную и дистальную, располагающиеся над халазальной областью проксимального района и не граничащие с эндоспермом. Первыми гибнут клетки проксимального района нуцеллуса, непосредственно окружающих эндосперм, что позволило предположить, что индуктором клеточной гибели клеток нуцеллуса является эндосперм (Lombardi et al., 2012). Эндосперм выделяет NO и индолилуксусную кислоту (IAA), которые усиливают синтез этилена, вызывающего гибель клеток нуцеллуса. При удалении эндосперма из семязачатка ПКГ нуцеллуса не наступает. При добавлении экзогенного этилена к ткани нуцеллуса блок гибели частично снимается (Lombardi et al., 2012). Наряду с влиянием гормонов была показана активность каспаза-1- и каспаза-3-подобных протеаз, выявленных с помощью специфических субстратов в проксимальной и субпроксимальной области нуцеллуса и каспаза-6-подобной протеазы в проксимальном районе нуцеллуса (Lombardi et al., 2007). В результате протеомного анализа тканей нуцеллуса *Ricinus communis* выявлены многочисленные протеазы, принадлежащие к классам цистеиновых, сериновых, аспартатных и металлопротеаз (Nogueira et al., 2012). Среди них стоит особо отметить протеазу XSP I (xylem serine protease), принимающую участие в гибели клеток ксилемы (Buhtz et al., 2004) и VPE (vacuolar processing enzyme), принимающий участие в ПКГ разнообразных тканей растений (Hatsugai et al., 2015). При ПКГ нуцеллуса было показано повышение экспрессии генов некоторых гидролитических ферментов: например, аспартатной протеазы нуцеллина (Chen, Foolad, 1997), α-амилазы AMY 4 (Radchuk et al., 2009), вакуолярного фермента нуцеллалина (Linnestad et al., 2009) у ячменя, катепсин-B-подобной протеазы (Domínguez, Cejudo, 1998) у пшеницы.

В ПКГ нуцеллуса *Ricinus communis* ключевую роль играют рициносомы, содержащие протеазу CysEP, имеющую терминальный KDEL мотив (Yang et al., 2012). Содержимое рициносом выбрасывается в цитоплазму, где активная протеаза CysEP участвует в разрушении содержимого клетки. В течение гибели наблюдается интенсивная вакуолизация цитоплазмы, фрагментация ДНК. На финальных стадиях гибели происходит разрыв тонопласта вакуоли, митохондрии и пластиды набухают, протопласт отходит от клеточной стенки (Greenwood et al., 2005).

На *Arabidopsis* было показано, что гибель клеток нуцеллуса связана с оплодотворением центральной клетки (Xu et al., 2016). У мутантов по гену *KPL,* содержащих только эндосперм, клетки нуцеллуса погибали, в отличие от мутантов, содержащих только зародыш. В неоплодотворенных семяпочках дегенерация нуцеллуса заблокирована Polycomb белками. При оплодотворении активируется транскрипционный фактор AGL62 (AGAMOUS-LIKE62), который снимает этот блок и активирует белки TT16 (TRANSPARENT TESTA 16) и GOA (GORDITA), которые вызывают гибель нуцеллуса (Xu et al., 2016). Белок MADS29 индуцирует гибель клеток нуцеллуса у *Oryza sativa* (Wan et al., 2002).

ПКГ нуцеллуса необходима для освобождения места для развивающегося эндосперма (Lu, Magnani, 2018).

ПКГ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СЕМЕННОЙ КОЖУРЫ

В клеточную гибель внутреннего интегумента семени у *Brassica napus* (Wan et al., 2002), и *Jatropha curcas* (Rocha et al., 2013; Shah et al., 2016; Rocha et al., 2018) и интегументов *Arabidopsis* (Ondzighi et al., 2008) вовлечены цистеиновые протеазы. PDI5 (protein disulfide isomerase), находясь в вакуолях клеток эндотелия *Arabidopsis*, ингибирует активность цистеиновой протеазы RD21. Со временем содержание PDI5 снижается, что способствует высвобождению протеаз и индукции гибели (Ondzighi et al., 2008).

У *Arabidopsis* первыми деградируют два слоя внутреннего интегумента, их гибель сопровождается плазмолизом и активацией цистеиновой протеазы VPE (Nakaune et al., 2005). Пока зародыш находится на ранних стадиях развития большую часть клеток внутреннего эпидермиса внутреннего интегумента *Arabidopsis* занимают вакуоли с белковым содержимым, в которых содержатся цистеиновые протеазы. Клеточная гибель сопровождается разрывом белковых вакуолей, выходом и активацией протеаз и деградацией клетки (Ondzighi et al., 2008). Гибель клеток внутреннего слоя интегумента *Brassica napus* сопровождается фрагментацией ДНК, вакуолизацией цитоплазмы (Bethke, Jones, 2001).

ГИБЕЛЬ ЭНДОСПЕРМА

Триплоидный эндосперм, как и зародыш, формируется в результате двойного оплодотворения. Эндосперм – главная запасающая ткань семени, накапливающая крахмал, масла и белки для питания зародыша. Эндосперм расходуется у всех растений, но в семенах с запасающим эндоспермом это происходит при прорастании семени, а в семенах с запасающим зародышем – при формировании семени.

В качестве модельных объектов для изучения ПКГ эндосперма, питательные вещества которого мобилизуются при прорастании, изучаются клетки эндосперма клещевины *Ricinus communis* и злаков.

У *Ricinus communis* в гибели клеток эндосперма участвуют рициносомы (Gietl et al., 2001; Schmid et al., 2001). В ходе гибели клеток эндосперма происходит фрагментация ДНК, разрыв тонопласта вакуоли, деградация митохондрий и пластид. На финальной стадии гибели из рициносом высвобождается цистеиновая протеаза CysEP, и, в закисленной за счет содержимого вакуолей цитоплазме происходит созревание CysEP. Активная протеаза CysEP вызывает окончательную деградацию клетки (Greenwood et al., 2005).

Развитие эндосперма в семенах злаков включает этапы пролиферации, накопления питательных веществ (прежде всего, крахмала) и программируемой клеточной гибели, происходящей на поздних этапах формирования семени (Domínguez, Cejudo, 2014). ПКГ клеток эндосперма с крахмалом у *Triticum aestivum* и *Oryza sativa* сопровождается деформацией ядра, конденсацией хроматина, распадом ядерной оболочки и вакуолизацией цитоплазмы (Chen et al., 2012). Одновременно в клетках повышается количество активных форм кислорода (АФК), и активируются антиоксидантные ферменты (каталаза, супероксидодисмутаза, пероксидаза), которые не в состоянии справиться с нарастающим количеством АФК (Young et al., 2002; Cheng et al., 2016). После дегенерации ядра и фрагментации ДНК в клетках продолжают работать ферменты AGPP (ADP-glucose pyrophosphorylase), SSS (soluble starch synthase), GBSS (granule-bound starch synthase), SBE (Starch branching enzyme), отвечающие за синтез запасающих веществ (Chen et al., 2012).

Предполагается, что индуктором клеточной гибели эндосперма является этилен. Ингибиторы синтеза этилена (2-aminoethoxyvinyl glycine 1-methylcyclopropene) препятствуют гибели клеток эндосперма. Абсцизовая кислота, предотвращает наступление клеточной гибели эндосперма, когда вступает в антагонистические отношения с этиленом (Young et al., 2002). Гиббереллиновая кислота увеличивает число гибнущих клеток эндосперма пшеницы (Kuo, 1996). Регуляторами клеточной гибели эндосперма *Arabidopsis thaliana* выступают факторы ZOU/RGE1 (bHLH TFs ZHOUPI/ RETARDED GROWTHOF EMBRYO 1) и ICE1 (INDUCER OF CBP EXPRESSION 1) (Denay et al., 2014).

В отличие от эндосперма, который подвергается процессу ПКГ на поздних стадиях развития семени, алейроновый слой вместе с зародышем остается живым в зрелом семени. После прорастания алейроновый слой участвует в синтезе гидролитических ферментов, необходимых для мобилизации питательных веществ из эндосперма. После выполнения этой функции запускается процесс ПКГ алейронового слоя (Domínguez, Cejudo, 2014). Гибель клеток алейронового слоя эндосперма *Hordeum vulgare* (Wang et al., 1996; Bethke, Jones, 2001; Bethke et al., 2007) и *Triticum aestivum* (Domínguez et al., 2001) сопровождается фрагментацией ДНК. Индуктором клеточной гибели алейронового слоя *Triticum aestivum* (Domínguez et al., 2001) выступает гибберелин, клеток культуры *Hordeum vulgare* – гиббереллиновая кислота (Bethke, Jones, 2001). Абсцизовая кислота препятствует гибели клеток алейронового слоя эндосперма ячменя, что было показано при обработке абсцизовой кислотой протопластов, изолированных из интактного зерна (Wang et al., 1996).

Разрушение клеток крахмального эндосперма завершает процесс накопления питательных веществ зерна, и обеспечивает их последующую доступность в прорастающем семени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каждый этап формирования тканей зародышевого мешка и семени сопровождается процессами ПКГ и имеет свои структурно-функциональные особенности. Причины разнообразия вариантов ПКГ этих тканей до конца не выяснены. Вероятно, пути ПКГ связаны с морфогенезами тканей формирующегося семени. Процессы клеточной гибели тканей при морфогенезе семени имеют общие черты либо с вакуолярной клеточной гибелью (вакуолизация цитоплазмы, формирование аутофагосом, разрыв тонопласта вакуоли), либо с некротической (апоптотической) (фрагментация ДНК, выход цитохрома с из митохондрий) (Van Doorn et al., 2011; Van Doorn, 2011; Reape, McCabe, 2013), либо им присущи особенности обоих путей.

В процессе формирования семени клетки, структуры и ткани последовательно сменяют друг друга, при этом одни обеспечивают функционирование других. Например, у растений с хорошо развитым подвеском он осуществляет поддержку и питание зародыша, антиподальные клетки злаков обеспечивают существование и правильное формирование эндосперма, который аккумулирует питательные вещества для последующего развития зародыша. При созревании семени ПКГ является инструментом удаления ненужных клеток и тканей, освобождая пространство и, вероятно, обеспечивая доступность питательных вещества для формирования новых тканей. Биохимические характеристики гибели антиподальных клеток культурных злаков, подвеска и эндосперма большинства покрытосеменных растений необходимы для понимания механизмов формирования семени.

К сожалению, многие аспекты ПКГ клеточных типов зародышевого мешка и семени до сих пор остаются неизученными. Недостаточно изучены молекулярные механизмы ПКГ. Выявлены отдельные белки-регуляторы процессов ПКГ, однако сигнальные каскады, участниками которых являются эти белки, остаются неизвестными.

Отрывочны данные о функционировании протеаз, регулирующих ПКГ. Не известно, участвуют ли протеазы в ПКГ мегаспор, синергид и антипод. Сигнальные каскады, приводящие к активации изученных протеаз, до сих не выяснены. Известна субстратная специфичность протеаз, принимающих участие в ПКГ, тем не менее в большинстве случаев деградомы (природные субстраты) метакаспаз, фитаспаз и других протеаз растений до сих не определены.

Исследования, посвященные ПКГ растений, не позволяют составить полную картину процессов, сопровождающих ПКГ. В связи с появлением данных о секвенировании геномов многих покрытосеменных растений и внедрением биохимических методов в рутинную практику изучения растительных объектов, в том числе таких сложных, как зародышевый мешок, возможен прорыв именно в области изучения молекулярных механизмов протекания и регуляции ПКГ.

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

Доронина Т.В., Чабан И.А., Лазарева Е.М. Структурно-функциональные особенности клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 4. С. 1–17.

An L.H., You R.L. Studies on nuclear degeneration during programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum* // Sex. Plant Reprod. 2004. V. 17. № 4. P. 195–201.

Bartoli G., Felici C., Castiglione M.R. Female gametophyte and embryo development in *Helleborus bocconei* Ten. (*Ranunculaceae*) // Protoplasma. 2017. V. 254. № 1. P. 491–504.

Bethke P.C. et al. Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells // The Plant Cell. 1999. V. 11. № 6. P. 1033–1045.

Bethke P.C., Jones R.L. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species // Plant J. 2001. V. 25. № 1. P. 19–29.

Bozhkov P.V. et al. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 40. P. 14463–14468.

Buhtz A. et al. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species // Planta. 2004. V. 219. № 4. P. 610–618.

Cao L. et al. Arabidopsis ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule // PLoS Genet. 2018. V. 14. № 3. P. 1–30.

Chaban I.A. et al. Antipodal complex development in the embryo sac of wheat // Russ. J. Dev. Biol. 2011. V. 42. № 2. P. 79–91.

Chaubal R., Reger B.J. Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries // Sex. Plant Reprod. 1992. V. 5. № 1. P. 34–46.

Chaubal R., Reger B.J. Prepollination degeneration in mature synergids of pearl millet: an examination using antimonate fixation to localize calcium // Sex. Plant Reprod. 1993. V. 6. № 4. P. 225–238.

Chaubal R., Reger B.J. The dynamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat after pollination // Sex. Plant Reprod. 1992. V. 5. № 3. P. 206–213.

Chen F., Foolad M.R. Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration // Plant Mol. Biol. 1997. V. 35. № 6. P. 821–831.

Chen Y. et al. Programmed cell death in wheat starchy endosperm during kernel development // African J. Agric. Res. 2012. V. 7. № 49. P. 6533–6540.

Cheng X.X. et al. Reactive oxygen species regulate programmed cell death progress of endosperm in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under waterlogging // Protoplasma. 2016. V. 253. № 2. P. 311–327.

Christensen C.A. et al. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant // Sex. Plant Reprod. 1997. V. 10. № 1. P. 49–64.

Christensen C.A. et al. Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis* // The Plant Cell. 2002. V. 14. № 9. P. 2215–2232.

Consonni G. et al. Analysis of four maize mutants arrested in early embryogenesis reveals an irregular pattern of cell division // Sex. Plant Reprod. 2003. V. 15. № 6. P. 281–290.

D'Amato F. Role of polyploidy in reproductive organs and tissues // Embryology of Angiosperms. Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. P. 519–566.

Daneva A. et al. Functions and regulation of programmed cell death in plant development // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2016. V. 32. P. 441–468.

Demesa-Arévalo E., Vielle-Calzada J.P. The classical arabinogalactan protein AGP18 mediates megaspore selection *in Arabidopsis* // The Plant Cell. 2013. V. 25. № 4. P. 1274–1287.

Denay G. et al. Endosperm breakdown in *Arabidopsis* requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUPI and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1 // Development. 2014. V. 141. № 6. P. 1222–1227.

Domínguez F., Cejudo F.J. Germination-related genes encoding proteolytic enzymes are expressed in the nucellus of developing wheat grains // Plant J. 1998. V. 15. № 4. P. 569–574.

Domínguez F., Cejudo F.J. Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination // Frontiers in Plant Science. 2014. V. 5. P. 366.

Domínguez F., Moreno J., Cejudo F.J. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 12. P. 11530–11536.

Dominguez F., Moreno J., Cejudo F.J. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development // Planta. 2001. V. 213. № 3. P. 352–360.

Dresselhaus T., Sprunck S., Wessel G.M. Fertilization mechanisms in flowering plants // Current Biology. 2016. V. 26. № 3. P. R125–R139.

Engell K. Embryology of barley. IV. Ultrastructure of the antipodal cells of *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi before and after fertilization of the egg cell // Sex. Plant Reprod. 1994. V. 7. № 6. P. 333–346.

Filonova L.H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce // J. Cell Sci. 2000. V. 113. № 24. P. 4399–4411.

Fu Y. et al. Changes in actin organization in the living egg apparatus of Torenia fournieri during fertilization // Sex. Plant Reprod. 2000. V. 12. № 6. P. 315–322.

Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // Cell Death Differ. 2018. V. 25. № 3. P. 486–541.

Gärtner P.J., Nagl W. Acid phosphatase activity in plastids (plastolysomes) of senescing embryo-suspensor cells // Planta. 1980. V. 149. № 4. P. 341–349.

Gietl C., Schmid M. Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues // Naturwissenschaften. 2001. V. 88. № 2. P. 49–58.

Giuliani C. et al. Programmed cell death during embryogenesis in maize // Ann. Bot. 2002. V. 90. № 2. P. 287–292.

Greenwood J.S., Helm M., Gietl C. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 6. P. 2238–2243.

Hamamura Y., Nagahara S., Higashiyama T. Double fertilization on the move // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. № 1. P. 70–77.

Hatsugai N. et al. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 234.

Heydlauff J., Groß-Hardt R. Love is a battlefield: programmed cell death during fertilization // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. № 5. P. 1323–1330.

Higashiyama T., Takeuchi H. The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance // Annual Review of Plant Biology. 2015. V. 66. P. 393–413.

Hiratsuka R., Yamada Y., Terasaka O. Programmed cell death of *Pinus nucellus* in response to pollen tube penetration // J. Plant Research. 2002. V. 115. № 2. P. 0141–0148.

Hofius D. et al. Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 8. P. 1257–1262.

Huang B.Q., Russell S.D. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration // Planta. 1994. V. 194. № 2. P. 200–214.

Hunt D.J.L., McCabe P.F. Death and rebirth: programmed cell death during plant sexual reproduction // Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells. 2017. P. 340–361.

Johri B.M., Ambegaokar K.B., Srivastava P.S. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer Science & Business Media, 2013. V. 1.

Kacprzyk J., Daly C.T., McCabe P.F. The botanical dance of death: programmed cell death in plants // Adv. Bot. Res. Academic Press, 2011. V. 60. P. 169–261.

Kägi C. et al. The gametic central cell of *Arabidopsis* determines the lifespan of adjacent accessory cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 51. P. 22350–22355.

Kawashima T., Goldberg R.B. The suspensor: not just suspending the embryo // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. № 1. P. 23–30.

Kessler S.A. et al. Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion // Science. 2010. V. 330. № 6006. P. 968–971.

Kuo A. et al. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells // The Plant Cell. 1996. V. 8. № 2. P. 259–269.

Leydon A.R. et al. Pollen tube discharge completes the process of synergid degeneration that is initiated by pollen tube-synergid interaction in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2015. V. 169. № 1. P. 485–496.

Linnestad C. et al. Nucellain, a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in nucellar cell walls // Plant Physiol. 1998. V. 118. № 4. P. 1169–1180.

Locascio A. et al. Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 412.

Lombardi L. et al. DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor // Plant Physiol and Biochemistry. 2007. V. 45. № 3–4. P. 221–227.

Lombardi L. et al. Ethylene produced by the endosperm is involved in the regulation of nucellus programmed cell death in Sechium edule Sw // Plant Sci. 2012. V. 187. P. 31–38.

Lombardi L. et al. Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. № 11. P. 2949–2958.

López-Fernández M.P., Maldonado S. Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*) // Ann. Bot. 2013. V. 112. № 7. P. 1253–1262.

Lu J., Magnani E. Seed tissue and nutrient partitioning, a case for the nucellus // Plant Reproduction. 2018. V. 31. № 3. P. 309–317.

Maeda E., Miyake H. Ultrastructure of antipodal cells of rice (*Oryza sativa*) after anthesis, as related to nutrient transport in embryo sac // Japanese J. Crop Sci. 1996. V. 65. № 2. P. 340–351.

Maizel A. A view to a kill: markers for developmentally regulated cell death in plants // Plant Physiol. 2015. V. 169. № 4. P. 2341–2341.

Minina E.A. et al. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants // J. Cell Biol. 2013. V. 203. № 6. P. 917–927.

Mogensen H.L. Pollen tube-synergid interactions in *Proboscidea louisianica* (Martineaceae) // Am. J. Bot. 1978. V. 65. № 9. P. 953–964.

Nagl W. "Plastolysomes"—plastids involved in the autolysis of the embryo-suspensor in phaseolus // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1977. V. 85. № 1. P. 45–51.

Nagl W. The phaseolus suspensor and its polytene chromosomes // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1974. V. 73. № 1. P. 1–44.

Nakaune S. et al. A vacuolar processing enzyme, δVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development // The Plant Cell. 2005. V. 17. № 3. P. 876–887.

Ngo Q.A. et al. A calcium dialog mediated by the FERONIA signal transduction pathway controls plant sperm delivery // Dev. Cell. 2014. V. 29. № 4. P. 491–500.

Nogueira F.C.S. et al. Proteomic profile of the nucellus of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds during development // J. Proteomics. 2012. V. 75. № 6. P. 1933–1939.

Olvera-Carrillo Y. et al. A conserved core of programmed cell death indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants // Plant Physiol. 2015. V. 169. № 4. P. 2684–2699.

Ondzighi C.A. et al. Arabidopsis protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds // The Plant Cell. 2008. V. 20. № 8. P. 2205–2220.

Papini A. et al. Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae) // Protoplasma. 2011. V. 248. № 4. P. 651–662.

Peng X., Sun M.X. The suspensor as a model system to study the mechanism of cell fate specification during early embryogenesis // Plant Reprod. 2018. V. 31. № 1. P. 59–65.

Olsen O.A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana* // The Plant Cell. 2004. V. 16. P. S214–S227.

Pereira A.M. et al. "Love is strong, and you're so sweet": JAGGER is essential for persistent synergid degeneration and polytubey block in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2016. V. 9. № 4. P. 601–614.

Petrussa E. et al. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba* // Planta. 2009. V. 231. № 1. P. 93–107.

Qiu Y.L. et al. Calcium changes during megasporogenesis and megaspore degeneration in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // Sex. Plant Reprod. 2008. V. 21. № 3. P. 197–204.

Radchuk V.V. et al. Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain // Plant Physiol. 2009. V. 150. № 1. P. 190–204.

Reape T.J., McCabe P.F. Apoptotic-like programmed cell death in plants // New Phytologist. 2008. V. 180. № 1. P. 13–26.

Reape T.J., McCabe P.F. Commentary: the cellular condensation of dying plant cells: programmed retraction or necrotic collapse? // Plant Sci. 2013. V. 207. P. 135–139.

Rocha A.J. et al. Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*) // Plant Sci. 2013. V. 213. P. 30–37.

Rocha A.J., Pohl S., Fonteles C.S.R. Cloning and gene expression analysis of two cDNA of cysteine proteinase genes involved in programmed cell death in the inner integument from developing seeds of *Jatropha curcas* L. // Gene Expr. Patterns. 2018. V. 27. P. 122–127.

Russell S.D. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays* // Can. J. Bot. 1979. V. 57. № 10. P. 1093–1110.

Schmid M. et al. The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 9. P. 5353–5358.

Schmid M., Simpson D., Gietl C. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 24. P. 14159–14164.

Shah M. et al. Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas* // J. Proteomics. 2016. V. 143. P. 346–352.

Smertenko A.P. et al. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos // Plant J. 2003. V. 33. № 5. P. 813–824.

Tian H.Q., Russell S.D. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. // Planta. 1997. V. 202. № 1. P. 93–105.

Üstün S., Hafren A., Hofius D. Autophagy as a mediator of life and death in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2017. V. 40. P. 122–130.

Van Doorn W.G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 14. P. 4749–4761.

Van Doorn W.G. et al. Morphological classification of plant cell deaths // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 8. P. 1241–1246.

Van Hautegem T. et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development // Trends Plant Sci. 2015. V. 20. № 2. P. 102–113.

Völz R. et al. Ethylene signaling is required for synergid degeneration and the establishment of a pollen tube block // Dev. Cell. 2013. V. 25. № 3. P. 310–316.

Wan L. et al. Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument // Plant J. 2002. V. 30. № 1. P. 1–10.

Wang M. et al. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid // Plant Mol. Biol. 1996. V. 32. № 6. P. 1125–1134.

Wang P., Mugume Y., Bassham D.C. New advances in autophagy in plants: regulation, selectivity and function // Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press, 2018. V. 80. P. 113–122.

Wredle U., Walles B., Hakman I. DNA fragmentation and nuclear degradation during programmed cell death in the suspensor and endosperm of *Vicia faba* // International J. Plant Scis. 2001. V. 162. № 5. P. 1053–1063.

Wu J.J. et al. Mitochondrial GCD1 dysfunction reveals reciprocal cell-to-cell signaling during the maturation of *Arabidopsis* female gametes // Dev. Cell. 2012. V. 23. № 5. P. 1043–1058.

Xu W. et al. Endosperm and nucellus develop antagonistically in *Arabidopsis* seeds // The Plant Cell. 2016. V. 28. № 6. P. 1343–1360.

Yadegari R., Drews G.N. Female gametophyte development // The Plant Cell. 2004. V. 16. P. 133–141.

Yang X. et al. Live and let die-the Bsister MADS-box gene OsMADS29 controls the degeneration of cells in maternal tissues during seed development of rice (*Oryza sativa*) // PLoS One. 2012. V. 7. № 12. P. e51435.

Young T.E., Gallie D.R. Programmed cell death during endosperm development // Programmed Cell Death in Higher Plants. Springer, Dordrecht, 2000. P. 39–57.

Zhao P. et al. A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos // PLoS Biology. 2013. V. 11. № 9. P. e1001655.

Zhimulëv I.F. Morphology and structure of polytene chromosomes // Advances in Genetics. Academic Press, 1996. V. 34. P. 1–490.

Zhuang X. et al. ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 3. P. E426–E435.

Programmed Cell Death during the Formation of Embryo Sac and Seed

T. V. Doronina[1,]*, E. V. Sheval[1,2], and E. M. Lazareva[1]

[1]*Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

[2]*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: matveevatatiana.94@yandex.ru*

The process of programmed cell death is essential for plant ontogenesis. Seed development reveals the key role of programmed cell death in cell elimination and formation of new structures. Morphological data and biochemical regulators of programmed cell death during the embryo sac and seed formation are discussed in the review.

Keywords: programmed cell death, plants, embryo sac, seed, morphogenesis

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 177–192

ОБЗОРЫ

УДК 591.169:591.3:591.4

РЕГЕНЕРАЦИЯ У АННЕЛИД: КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ, ТКАНЕВЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

© 2020 г. Д. Д. Никанорова[a], Е. Е. Купряшова[a], Р. П. Костюченко[a, *]

[a]*Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия*

**e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru*

Поступила в редакцию 21.01.2020 г.
После доработки 28.01.2020 г.
Принята к публикации 31.01.2020 г.

Недавние работы показали, что, несмотря на стереотипное дробление, аннелиды демонстрируют способность к эмбриональным регуляциям, в том числе при формировании линии половых клеток. Вместе с тем наиболее широко процессы регуляции представлены в ходе постларвального развития аннелид. Способность к регенерации, являющейся, вероятно, анцестральным признаком, проявляется по-разному среди этих животных. Некоторые виды не способны регенерировать утраченные сегменты. Однако большинство видов восстанавливают задние части тела, многие способны восстанавливать головные сегменты и структуры, а некоторые развивают все тело *de novo* даже на основе одного-двух сегментов. Большая часть восстанавливаемых структур формируется за счет набора недифференцированных клеток, возникающих при делении дедифференцированных и/или стволовых клеток. При этом процесс регенерации часто приводит к перестройке старых фрагментов тела, и может, таким образом, быть связанным не только с локальными изменениями, но и требовать реакции на уровне всего организма. В этом обзоре мы обобщаем многие современные исследования относительно молекулярных и клеточных механизмов регенерации у аннелид. Особое внимание уделено восстановлению пищеварительной и нервной систем, покровов, а также участию стволовых и недифференцированных клеток в развитии бластемы и в восстановлении гонад. Накопление и анализ современных знаний о разнообразии клеточных источников и механизмов регенерации аннелид могут пролить свет на наиболее эволюционно консервативные программы поддержания способности к регенерации и на процессы, ведущие к потере (ограничению) одного из анцестральных свойств животных.

Ключевые слова: регенерация, дедифференциация, мультипотентные клетки, стволовые клетки, половые клетки, экспрессия генов, пищеварительная система, нервная система, перестройка тканей, аннелиды

DOI: 10.31857/S0475145020030040

ВВЕДЕНИЕ

Регенерация – процесс восстановления утраченных клеток, тканей, органов и частей тела и их функций – является фундаментальным свойством живых систем. Даже животные, для которых характерно постоянство клеточного состава (эутелия), способны к ограниченной физиологической регенерации (Короткова, 1997; Stocum, 2012). Вместе с тем, вопрос о том, почему у одних видов наблюдаются почти безграничные возможности к восстановлению утраченных частей, а у их ближайших родственников – нет, остается наиболее интригующим и далеким от решения.

Существует немало модельных объектов, с использованием которых активно ведется поиск решения проблем регенерации. Это такие простые животные как гидры и планарии, или более сложно устроенные аннелиды, иглокожие, асцидии и позвоночные, включая человека (Короткова, 1997; Stocum, 2012; Костюченко, Козин, 2020). Современные технологии позволяют проводить исследования на клеточных культурах, что значительно облегчает создание контролируемых условий. Однако очевидно, что полноценное решение фундаментальных и практических проблем регенерации возможно только на организменном уровне (Stocum, 2012; Новикова и др., 2020).

Несмотря на пристальное внимание исследователей к феномену регенерации, многие механизмы этого процесса до сих пор не раскрыты. Среди них – природа клеточных источников, вносящих вклад в формирование регенерата. Основываясь на данных по регенерации многих модельных объектов, можно предположить, что наиболее часто встречаются четыре механизма восстановления тканей: повторный рост клеточных частей, таких как нервные аксоны; пролиферация дифференцированных клеток, претерпевающих или не претерпевающих дедифференцировку; трансдифференцировка и активация взрослых стволовых клеток. Вместе с тем эпиморфная регенерация, для которой характерна высокая пролиферативная активность различных клеток, сопровождается признаками морфаллаксиса. Морфаллаксис, процесс восстановления утерянных частей за счет перестройки старых тканей без активной пролиферации клеток, может быть выражен в разной степени. В некоторых случаях регенерация может осуществляться исключительно по типу морфаллаксиса (Stocum, 2012; Костюченко, Козин, 2020). Очевидно, что сочетание дедифференцировки, активации стволовых клеток, пролиферации и реорганизации остатка (ткани, органа и т.д.) существенно увеличивает сложность механизмов инициации и регуляции процессов регенерации. Вне всякого сомнения, использование различных моделей животных позволит получить максимально полное представление о процессах регенерации и использовать эти знания в практических целях.

В настоящем обзоре мы обобщаем многие данные о молекулярных и клеточных механизмах регенерации у аннелид, одной из ключевых для эволюционной биологии развития групп билатеральных животных. Аннелиды, как и другие спиральные животные, демонстрируют стереотипное эмбриональное развитие, хотя и с элементами регуляции (Костюченко, Дондуа, 2006, 2017; Nakamoto et al., 2010; Козин и др., 2013; Wanninger, 2015; Kozin et al., 2016; Lanza, Seaver, 2018). Однако взрослые животные, заметно различающиеся по строению, жизненному циклу и экологическим условиям обитания, как правило, восстанавливают утраченные ткани и части тела, демонстрируя в ряде случаев почти неограниченные способности к регенерации, в том числе и при бесполом размножении (Короткова, 1997; Харин и др., 2006; Bely, Sikes, 2010; Zattara, Bely, 2011; Костюченко и др., 2016; de Jong, Seaver, 2018; Костюченко, Козин, 2020). Все это делает аннелид перспективной моделью для изучения как молекулярных и клеточных механизмов регенерации и бесполого размножения, так и эволюции программ развития.

БЛАСТЕМА: КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ И СПЕЦИФИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

Посттравматическая регенерация большинства аннелид происходит по типу эпиморфоза, то есть с формированием регенерационной почки, состоящей из активно пролиферирующих, недифференцированных клеток. Общепринято, что клетки, входящие в состав всех трех зародышевых листков, участвуют в восстановлении утраченных участков тела (Paulus, Müller, 2006; Bely, 2014; Костюченко и др., 2016). Большинство работ подтверждает идею о независимых клеточных источниках экто-, мезо- и энтодермальных структур во время регенерации, поэтому имеет смысл рассмотреть их по отдельности. Восстановление производных мезодермы (целомический эпителий, гонады, кровеносные сосуды, метанефридии) и эктодермы (нервная система, покровы тела) тесным образом связано с формированием регенерационной почки.

В состав регенерационной почки входит бластема (масса внутренних недифференцированных клеток) и покрывающий ее эпителий. Неоднократно было показано, что раневой эпителий формируется за счет реаранжировки клеток покровного эпителия, а не за счет их пролиферации. Этот факт был подтвержден как с использованием гистологических методов (Turner, 1934; Fontés et al., 1983; Dupin et al., 1991), так и методом включения BrdU и EdU (Zattara, Bely, 2011; Planques et al., 2019). Кроме того, ингибирование пролиферации цитостатическим препаратом гидроксикарбамидом не приводило к нарушению формирования раневого эпителия (Planques et al., 2019). Тем не менее, пролиферация клеток покровного эпителия может происходить на более поздних стадиях.

Напротив, клетки бластемы активно делятся. Пролиферация внутренних клеток регенерационной почки подтверждается включением предшественников ДНК: EdU или BrdU (Zattara, Bely, 2011; Sugio et al., 2012; Kozin, Kostyuchenko, 2015; de Jong, Seaver, 2018; Planques et al., 2019). В недавнем исследовании активное деление клеток бластемы было показано с использованием молекулярных маркеров. *CyclinB1*, *cyclinB3* и *pcna* — гены, белковые продукты которых участвуют в процессе репликации ДНК, и могут служить надежными маркерами пролиферирующих клеток. В дополнение к этому был проведен и функциональный анализ: инкубация червей в ингибиторе пролиферации гидроксикарбамиде привела к нарушению формирования задней зоны роста и восстановлению утраченных сегментов (Planques et al., 2019). Таким образом, пролиферация клеток бластемы является необходимым событием для регенерации.

Выяснение происхождения клеток, формирующих бластему, необходимо для понимания источников восстановления структур мезо- и эктодермальной природы. С одной стороны, большинство исследований поддерживает идею о дедифференцировке клеток с последующей редифференцировкой. С другой стороны, многие авторы предполагают наличие специализированной линии соматических стволовых клеток. И в том и в другом случае клетки могут либо мигрировать из отдаленных сегментов, либо изначально находиться в сегменте рядом с раной. Таким образом, есть всего четыре гипотетические возможности происхождения клеток бластемы: миграция удаленных стволовых элементов, миграция дедифференцированных клеток, локальная дедифференцировка, локальное происхождение стволовых клеток (Planques et al., 2019). Однако их комбинирование в различных сочетаниях может значительно менять условия взаимодействия между клетками, в том числе на уровне ниши стволовых клеток. Отличительной особенностью стволовых клеток является их пролиферация до начала регенерации, в то время как дедифференцировка клеток происходит в ответ на ампутацию. Как известно, надежными маркерами недифференцированного состояния клеток у беспозвоночных являются продукты генов программы поддержания половых и мультипотентных клеток (Germline/Multipotency Program genes) (Juliano et al., 2010). Экспрессия *de novo* этих генов в составе регенерационной бластемы будет говорить о локальном происхождении клеток бластемы, тогда как обнаружение клеток с подобным профилем экспрессии в интактных сегментах может свидетельствовать в пользу миграции. Таким образом, изучение пролиферативной активности и анализ паттерна экспрессии генов GMP позволят отличить дедифференцировку от участия стволовых клеток и миграцию от локальной активации пролиферативной активности.

Использование этих двух методов позволило утверждать о превалирующей роли процессов дедифференцировки клеток, расположенных рядом с раной в ходе задней регенерации *Platynereis dumerilii* (Planques et al., 2019). Авторы инкубировали червей в растворе EdU до проведения операции по удалению сегментов, с целью выявления стволовых клеток, постоянно находящихся в клеточном цикле. Подавляющее большинство клеток бластемы было свободно от метки, что говорит о незначительном вкладе миграции в формирование бластемы. Однако, схема этого эксперимента не позволяет выявить стволовые клетки, находящиеся в фазе покоя до момента ампутации. Проведение эксперимента по модифицированной схеме (с предварительной ампутацией, призванной стимулировать покоящиеся стволовые элементы к делению) позволило подтвердить, что бластема формируется в основном из клеток прилегающего к ране сегмента, без миграции отдаленных элементов (Planques et al., 2019). В пользу дедифференцировки клеток свидетельствует обнаружение *de novo* экспрессии генов GMP (*Pdum-piwiA*, *Pdum-piwiB*, *Pdum-vasa*, *Pdum-nanos*, *Pdum-pl10*, *Pdum-myc*) во внутренних клетках бластемы (Planques et al., 2019) (рис. 1).

Для большинства других полихет также была показана главенствующая роль процессов дедифференцировки клеток, расположенных рядом с раной (Paulus, Müller, 2006; Kozin, Kostyuchenko, 2015). Недавняя работа на полихете *Alitta virens* убедительно продемонстрировала, что в ходе задней регенерации происходит *de novo* экспрессия генов-маркеров стволовых и мультипотентных клеток *vasa*, *piwi* и *pl10*, ассоциированная с покровным эпителием и внутренними клетками регенерата. Авторы указывают на отсутствие миграции клеток с подобным профилем экспрессии, что согласуется с идеей о дедифференцировке. Сопоставляя данные гибридизации *in situ* и картины включения клетками BrdU, авторы отмечают некоторое несовпадение меток. В частности, в эпителии обнаруживаются делящиеся клетки, не экспрессирующие гены GMP, а в бластеме напротив – обнаружены GMP-позитивные клетки, не находящиеся в фазе митоза. Таким образом, активация экспрессии изученных генов из числа GMP не является необходимой для поддержания пролиферативной активности клеток (Kozin, Kostyuchenko, 2015). Следует, однако, отметить, что методы анализа функций различных генов у аннелид начали развиваться лишь в последнее время. Обнаруженный у *E. japonensis* ген *grimp* является единственным, чья роль в формировании бластемы подтверждена функционально: использование двуцепочечной РНК этого гена в ходе РНК-интерференции привело к подавлению процесса формирования бластемы (Takeo et al., 2010).

На более поздних стадиях регенерации экспрессия генов GMP наблюдается в клетках вновь образованной задней зоны роста. Молекулярный профиль задней зоны роста варьирует у разных видов аннелид. Для полихеты *Capitella teleta* показана экспрессия гомологов *piwi, vasa* и *nanos* в задней зоне роста ювенильных червей (Dill, Seaver, 2008). В ходе регенерации клетки задней зоны роста накапливают транскрипты *piwi* (Giani et al., 2011). *Platynereis dumerilii* демонстрирует экспрессию гомологов *piwi*, *vasa*, *pl10* и *nanos* в задней зоне роста ювенильных и регенерирующих червей (Planques et al., 2019). Клетки задней зоны роста олигохеты *E. japonensis* накапливают транскрипты *vasa* в ходе нормального роста и регенерации (Tadokoro et al., 2006). Напротив, экспрессия *vasa* отсутствует в задней зоне роста олигохеты *Tubifex tubifex* (Oyama, Shimizu, 2007). Вероятно, функцию отсутствующего белка Vasa выполняет родственная ей РНК-хеликаза p68 (Oyama et al., 2008).

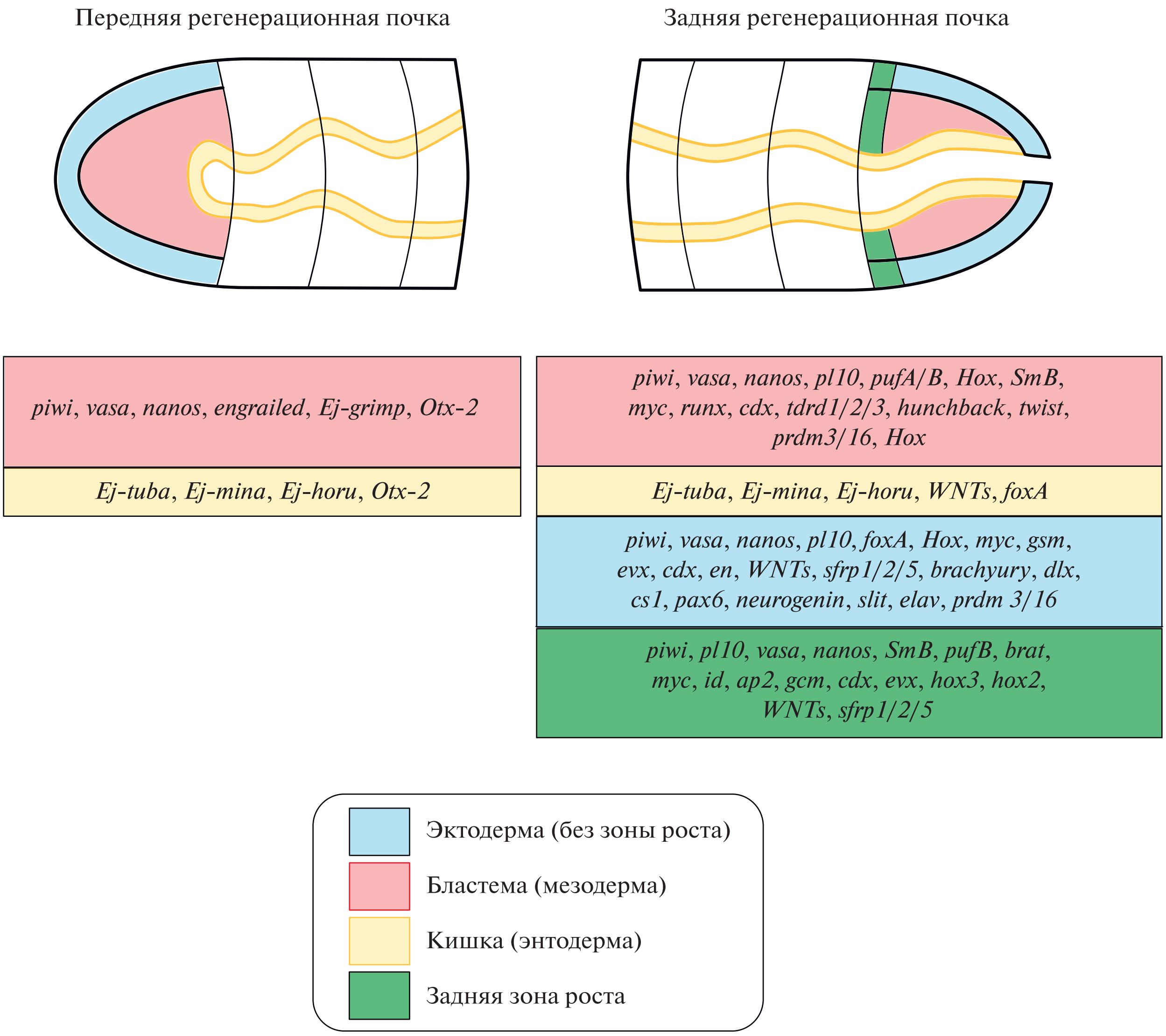

Рис. 1. Дифференциальная экспрессия генов в ходе регенерации аннелид на основе данных гибридизации *in situ*. На схеме передний конец тела направлен налево, задний – направо. Схема составлена на основе следующих источников: Bely, Wray, 2001; de Rosa et al., 2005; Tadokoro et al., 2006; Paulus, Müller, 2006; Dill, Seaver, 2008; Takeo et al., 2008, 2010; Giani et al., 2011; Pfeifer et al., 2012; Novikova et al., 2013; Gazave et al., 2013; Kozin, Kostyuchenko, 2015; Özpolat, Bely, 2015; de Jong, Seaver, 2016, 2018; Planques et al., 2019; Kostyuchenko et al., 2019. Небольшой набор генов, эксперссирующихся при замещении недостающего головного конца, отражает лишь слабую изученность моделей с передней регенерацией методом гибридизации *in situ*. Дополнительную информацию см. в разделе “Перспективы: молекулярные подходы”.

В геномах большинства изученных аннелид обнаружено по два гомолога гена *piwi*. Филогенетический анализ показывает, что они образовались в результате дупликации на заре эволюции билатерий (Giani et al., 2011). Дупликация гена и последующая дивергенция копий обычно связаны с разделением функций. Действительно, паттерн экспрессии паралогов *piwi1* и *piwi2* различается в регенерационной почке *A. virens*. *Avi-piwi1* экспрессируется на ранних стадиях в клетках раневого эпителия и во внутренних клетках бластемы, а также маркирует вновь сформированную заднюю зону роста. Транскрипты *Avi-piwi2* обнаружены исключительно во внутренних клетках бластемы, но не в клетках задней зоны роста (Kozin, Kostyuchenko, 2015). С другой стороны, несмотря на давнюю дивергенцию, паралоги *piwi1* и *piwi2* у *C. teleta* транскрибируются в одних и тех же структурах в ходе всего жизненного цикла и регенерации (Giani et al., 2011). Таким образом, несмотря на высокий уровень гомологии между ортологами *piwi*, они могут специализироваться на выполнении разных функций у разных видов. В целом, вариации в наборе генов GMP, вовлеченных в процесс восстановления задней зоны роста и утраченных сегментов у разных аннелид, могут говорить о тонких различиях в регуляции возмещения утраченных задних структур.

Еще до обособления зоны роста клетки задней части бластемы *P. dumerilii* экспрессируют тканеспецифичные гены, например *Pdum-twist*, ответственный за дифференцировку в мышечные клетки (Planques et al., 2019). После формирования зоны роста *twist*+ клетки обнаружены в передней части бластемы, что говорит о будущей их дифференцировке в мышечные элементы нового сегмента. Экспрессия *Pdum-prdm3/16* в клетках бластемы позволяет предположить их коммитирование в сторону предшественников кровеносных сосудов. Начало закладки специализированных конечностей полихет – параподий – знаменуется экспрессией *Pdum-dlx*. Наконец, о формировании новых элементов нервной системы можно судить по экспрессии генов *Pdum-pax6* и *Pdum-neurogenin*. Таким образом, клетки бластемы коммитированы к приобретению определенной клеточной судьбы еще на самых ранних стадиях регенерации. Столь ранняя спецификация клеток бластемы может свидетельствовать в пользу сохранения дедифференцированными клетками бластемы принадлежности к определенному зародышевому листку. Это также может свидетельствовать о мультипотентном, а не плюрипотентном статусе клеток бластемы.

Идея о транс- или дедифференцировке локальных клеточных элементов была не раз подтверждена и с помощью классических методов биологии развития. Восстановление мышечных клеток происходит, согласно гистологическому исследованию задней регенерации полихеты *Owenia fusiformis*, благодаря дедифференцировке, активному делению и последующей редифференцировке миоцитов (Dupin et al., 1991). Эпителиоциты на вентральной стороне бластемы у *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Ophidonais serpentina* и *Lumbriculus inconstans* способны мигрировать внутрь и участвовать в закладке нервных ганглиев (Turner, 1934; Bilello, Potswald, 1974; Cornec et al., 1987). Более того, в ряде ранних работ описано формирование мезодермальных производных исключительно за счет структур эктодермальной природы (Hepke, 1897; Michel, 1898; Abel, 1902; Wagner, 1906, цитировано по Bilello, Potswald, 1974). На основе данных, полученных в нашей лаборатории, было предположено вероятное выселение клеток дедифференцированного покровного эпителия и образование ими материала бластемы в ходе бесполого размножения у олигохет *Pristina longiseta* и *Nais communis* (Харин и др., 2006). Клетки покровного эпителия не только имеют сходное с клетками бластемы тонкое строение, но, как и последние, экспрессируют гены *vasa, pl10* и *piwi*. Таким образом, бластема при бесполом размножении у олигохет, может быть сформирована, как минимум частично, за счет дедифференцированных клеток покровного эпителия (Костюченко и др., 2016).

Несмотря на то, что для полихет в основном показано участие дедифференцированных клеток старых тканей в формировании регенерата, исследование, проведенное на *Capitella teleta* с использованием двух разных предшественников ДНК (EdU и BrdU), демонстрирует активную миграцию клеток в ходе задней регенерации (de Jong, Seaver, 2018). Авторы показали, что возможным источником мигрирующих *vasa*-позитивных клеток является кластер мультипотентных стволовых клеток (MPC), расположенный в пятом сегменте червя. С использованием дополнительных молекулярных маркеров была показана гетерогенность кластера MPC. Все его клетки экспрессируют гомологи *vasa*, *piwi*, *nanos*, однако лишь небольшая субпопуляция клеток оказывается *myc*-позитивной. Авторы характеризуют кластер как гетерогенную популяцию мультипотентных стволовых клеток, которая может вносить вклад в формирование задней регенерационной бластемы. При отрезании пяти передних сегментов (то есть, включая MPC) черви утрачивали способность восстановить задние сегменты. При отсечении четырех передних сегментов так, что MPC оставался в составе регенерирующего фрагмента, особи восстанавливали от одного до трех утраченных сегментов. Контрольные животные, имеющие все головные сегменты, регенерировали до 12-ти задних сегментов. В обеих экспериментальных группах не наблюдалось восстановление задней зоны роста, что авторы объясняют неспособностью червей питаться. Анализируя эти результаты, авторы делают вывод о том, что сохранение MPC способствует восстановлению некоторого количества задних сегментов, компенсируя отсутствие зоны роста (de Jong, Seaver, 2018). Так как процесс задней регенерации был нарушен в обоих случаях ампутации передних сегментов (с или без кластера MPC), встает вопрос о роли головных структур в восстановлении задней зоны роста. Известно, что развитие заднего регенерата у полихеты *Alitta virens* и олигохеты *Tubifex tubifex* не происходит в отсутствие головного мозга (Короткова, 1997; Bely, 2014). Возможно, и в случае *C. teleta* критическую роль в обеспечении полноценной регенерации играет не обнаруженный авторами кластер, а некий неизвестный сигнал, источником которого являются головные сегменты.

В отличие от полихет, для поясковых аннелид (Clitellata) неоднократно были описаны клетки мезодермальной природы, ассоциированные с септами, которые мигрируют к раневой поверхности и вносят вклад в формирование внутренней части бластемы (Randolph, 1892; Turner, 1934; Bilello, Potswald, 1974; Cornec et al., 1987; Sugio et al., 2012). Хэрриет Рэндольф, автор первого описания таких клеток у *Lumbriculus,* назвала их "необластами", подразумевая присущие им стволовые потенции (Randolph, 1892). В настоящее время этот термин применяется, главным образом, в отношении линии плюрипотентных стволовых клеток у планарий (Newmark, Alvarado, 2001). Тем не менее, многие авторы сохраняют исходное значение данного термина и активно продвигают идею наличия у олигохет специализированной линии активно пролиферирующих и мигрирующих клеток (Костюченко и др., 2016).

Спустя почти век после открытия "необластов" у *Lumbriculus*, у олигохеты *Limnodrilus hoffmeisteri* была также описана миграция клеток, ассоциированных с септами, из предшествующих ране сегментов (Cornec et al., 1987). Судя по гистологическому описанию этих клеток, они имеют признаки недифференцированных клеточных элементов: веретеновидную форму, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, крупное ядро, интенсивно окрашивающуюся цитоплазму. Многие авторы предполагают, что миграция клеток линии необластов происходит по брюшной нервной цепочке (Bilello, Potswald, 1974; Cornec et al., 1987).

Ингибирование клеточной миграции имело разные последствия для передней и задней регенерации *Lumbriculus variegatus*. Оказалось, что небольшая бластема формируется на передней раневой поверхности, тогда как задняя регенерация полностью подавляется. Таким образом, авторы делают вывод о том, что в процессе передней регенерации происходит как миграция клеток, так и локальная дедифференцировка, тогда как задняя регенерация полностью обеспечивается миграцией (Tweeten, Anderson, 2008).

Недавние работы японских исследователей демонструют наличие у олигохеты *E. japonensis* "необластов", экспрессирующих *vasa* (Sugio et al., 2008; Sugio et al., 2012). С использованием гистологических методов совместно с методом включения BrdU, авторы убедительно показали, что эти клетки располагаются на задней поверхности септы брюшных сегментов, активно делятся в ответ на ампутацию и мигрируют внутри целомической полости к месту ранения, формируя значительную часть бластемы (Tadokoro et al., 2006; Yoshida-noro, Tochinai, 2010). Миграция, однако, происходит не по брюшной нервной цепочке, а внутри целомической полости, что противоречит ранним работам. Более того, клетки линии "необластов" располагаются у *E. japonensis* не только на вентральной стороне, но и на латеральных и дорсальной частях септы. Кроме очевидного по мнению авторов вклада "необластов", они отмечают, что в регенерационной почке происходит деление клеток в покровном эпителии, а также в стенке кишки. Из этого они заключают, что восстановление утраченных частей тела происходит за счет клеток, входящих в состав производных всех трех зародышевых листков, при этом мезодермальные производные восстанавливаются только за счет "необластов". Несмотря на столь прозрачный вывод, незаменимая роль "необластов" была недавно опровергнута у родственного вида.

Было произведено сравнение регенеративных способностей *E. japonensis*, размножающегося фрагментацией и *E. buchholzi*, практикующего половое развитие и не имеющего клеток типа "необластов" (Myohara, 2012). Оказалось, что особи вида *E. buchholzi* способны к восстановлению полноценного заднего конца тела и гипоморфного переднего конца. Было установлено, что эффективность передней регенерации зависит от места проведения ампутации: количество восстановленных сегментов уменьшается по мере продвижения вдоль переднезадней оси. У *E. japonensis*, напротив, при отрезании любого количества брюшных сегментов всегда происходит восстановление семи головных сегментов. Однако при разрезании червя на уровне головных сегментов, в составе которых нет "необластов", на передней раневой поверхности восстанавливаются лишь утраченные передние сегменты. В то же время, на задней раневой поверхности происходит восстановление либо хвостовых сегментов, либо нескольких головных, что приводит к формированию двухголовой особи. Таким образом, даже не содержащие "необластов" головные сегменты *E. japonensis* способны восстановить утраченные передний и задний концы тела, а значит, используют другие клеточные источники. Анализируя результаты, авторы приходят к выводу, что "необласты" нужны скорее для тонкой настройки процесса регенерации, обусловливая формирование всех семи головных сегментов. Такая настройка происходит, по мнению авторов, посредством того, что "необласты" придают сегментам тела позиционное значение восьмого сегмента. Соответственно, при ампутации на уровне любого туловищного сегмента, согласно полученной позиционной информации, бластема всегда будет формировать семь головных сегментов. Остается непонятным в таком случае, чем обусловлена разница между передней и задней раневой поверхностью, которая обеспечивает сохранение переднезадней оси в ходе регенерации (Короткова, 1997).

Для выяснения возможной причины, почему особи *E. buchholzi* способны восстановить лишь гипоморфный головной конец, авторы сравнили пролиферативную активность клеток в ходе передней регенерации у *E. buchholzi* и *E. japonensis* (Myohara, 2012). Используя BrdU, авторы показали, что делящиеся клетки появляются в большом количестве лишь на 4-й день регенерации у *E. buchholzi*, тогда как *E. japonensis* формирует крупную бластему уже на первый день. В результате было высказано предположение о влиянии "необластов" на пролиферативную активность клеток бластемы. Итак, обнаружив новые возможные функции "необластов", авторы оставляют открытым вопрос о клеточных источниках, формирующих внутреннюю часть бластемы.

Таким образом, несмотря на большое количество подробных исследований процесса регенерации, вопрос о клеточных источниках восстановления мезодермальных производных остается открытым. Многие авторы приписывают основную роль клеткам линии аннелидных необластов, однако, некоторые из них описывают эти клетки в ассоциации с брюшной нервной цепочкой (Randolph, 1892; Turner, 1934; Bilello, Potswald, 1974), тогда как другие наблюдают их миграцию в целомической полости. Вполне возможно, что, используя один и тот же термин "необласт", авторы описывают разные клеточные популяции.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КИШКИ В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У АННЕЛИД

Кишка кольчатых червей состоит из переднего, среднего и заднего отделов. Передняя и задняя кишка формируются в эмбриогенезе из эктодермы, тогда как средняя часть кишки имеет энтодермальное происхождение. Эмбриональное происхождение отделов кишечника определяет уровень пластичности кишки в ходе регенерации аннелид. В целом, для полихет показано восстановление энтодермальной кишки за счет интактной части кишечника, а эктодермальная глотка восстанавливается обычно посредством инвагинации покровного эпителия в бластему (Berrill, 1952).

Во время задней регенерации терминальный участок кишки обычно входит в состав регенерационной почки. Сразу после ампутации происходит резкое сокращение мышц в прилежащем к ране сегменте, что обеспечивает закрытие раны. У полихеты *A. virens* непосредственно после сокращения мышечных волокон происходит некоторое выпадение кишки. Перерезанные края кишечного и покровного эпителиев смыкаются друг с другом, таким образом, что целомическая полость предшествующего ране сегмента оказывается изолированной от внешней среды. В то же время связь кишечника с внешней средой не утрачивается (Козин и др., 2017). По такому же механизму происходит закрытие раны на заднем конце тела у олигохеты *E. japonensis* (Myohara et al., 1999). Такой тип заживления раны называют "открытым". Закрытый тип является более распространенным и представляет собой опосредованное мышечным сокращением стягивание краев раны к центру, что приводит к смыканию отдельно покровного и кишечного эпителия. В результате кишечная трубка оказывается слепо замкнутой (Короткова, 1997). Некий промежуточный вариант с выпадением части кишки, но последующим ее втягиванием и смыканием краев покровного эпителия над ней описан для *Dorvillea bermudensis* (Paulus, Müller, 2006).

Процесс закрытия раны может быть ассоциирован с морфаллактическими перестройками, как это было показано для полихет *P. dumerilii* и *A. virens*. Транскрипты *foxA* (гена, кодирующего специфичный для развития кишки транскрипционный фактор) были показаны на стадии закрытия раны в клетках терминального, слегка выпадающего участка кишечного эпителия. Столь ранняя экспрессия в интактных тканях свидетельствует о морфаллактических перестройках. Основываясь на результатах исследования, авторы предполагают возможную сигнальную роль терминального участка кишки. В дальнейшем экспрессия *foxA* сопровождает восстановление пищеварительной системы у обоих исследованных видов (Kostyuchenko et al., 2019).

Последующее восстановление кишки в составе заднего регенерата связано в первую очередь с пролиферацией стволовых элементов кишечного эпителия. С целью выявления клеток стволовой линии, была проведена предварительная инкубация червей *P. dumerilii* в растворе EdU. Выявление сигнала на пятый день регенерации привело к неожиданным результатам. Оказалось, что почти все клетки вновь сформированного кишечного эпителия содержали метку EdU. Эти результаты подтверждают идею о том, что в кишечном эпителии имеются стволовые клетки, в норме необходимые для физиологической регенерации кишечного эпителия (Planques et al., 2019). Вероятно, эти клетки могут участвовать в посттравматической регенерации кишки в ответ на ампутацию части сегментов. Активное размножение клеток интактного кишечника в ответ на ампутацию было неоднократно доказано методами авторадиографии и гистологии (Hill, 1970).

Наличие определенного отдела кишки в составе регенерирующей особи может иметь критическое значение для процесса задней регенерации. Например, для таких видов полихет, как *Autolitus pictus*, *Procerastea halleziana* и *Syllis* sp. показана необходимость присутствия в составе регенерирующего фрагмента энтодермальной (средней) кишки. Головные сегменты, содержащие только глотку, имеющую эктодермальное происхождение, не могут регенерировать задние сегменты, в состав которых входит кишка энтодермальной природы (Berrill, 1952).

Восстановление кишки во время передней регенерации имеет ряд особенностей, связанных с тем, что заживление раны в большинстве случаев происходит по “закрытому” типу, то есть обрезанный край кишки становится слепо замкнутым. Более того, активно пролиферирующие клетки бластемы занимают все пространство между интактной кишкой и покровным эпителием, поэтому ротовое отверстие формируется *de novo* (Hill, 1970). Полихеты *Syllis gracilis* и *Procerastea halleziana* восстанавливают ротовое отверстие, глотку и преджелудок посредством инвагинации покровного эпителия внутрь бластемы. Растущий внутрь зачаток новой кишки вскоре соединяется с интактным кишечником (Berrill, 1952). Оба вида способны к полноценной передней регенерации: они восстанавливают все утраченные передние сегменты даже из небольшого фрагмента тела. Большинство же полихет обладает ограниченной способностью к передней регенерации. Многочисленные полихеты семейства Syllidae восстанавливают не более четырех головных сегментов. При этом не происходит инвагинации стомодеума и восстановления глотки, а ротовое отверстие формируется за счет слияния старой кишки с покровным эпителием, либо кишка не восстанавливается вовсе. Тем не менее, формирование кишки даже в пределах всего лишь четырех сегментов предполагает увеличение количества клеток. Действительно, клетки интактного кишечного эпителия *Sabella melanostigma* включают радиоактивную метку H^3-тимидина, что говорит об их пролиферативной активности (Hill, 1970). Формирование глотки посредством инвагинации эпителия может происходить в соответствии с переднезадним градиентом тела. Некоторые виды, например *Autolytus pictus*, оказываются способны к восстановлению только при ампутации небольшого числа передних сегментов. Таким образом, формирование глотки путем инвагинации является критическим моментом передней регенерации полихет и может определять количество восстановленных сегментов (Okada, 1929).

На основании этих данных Беррилл (Berrill, 1952) делает следующие выводы о восстановлении кишки в ходе регенерации полихет. Во-первых, эктодермальная передняя кишка (ротовая полость и глотка) может быть восстановлена только путем инвагинации покровного эпителия внутрь бластемы. Интактная кишка энтодермальной природы не может обеспечить формирование глотки. Во-вторых, в ходе задней регенерации энтодермальная кишка не может быть восстановлена за счет клеток эктодермальных структур (в т.ч. глотки). Согласно автору, энтодермальная кишка способна удлиняться только в заднем направлении (Berrill, 1952). Этим, по-видимому, отчасти объясняются различия передней и задней регенерации полихет.

По сравнению с полихетами, кишка олигохет обладает большей пластичностью в ходе регенерации (Короткова, 1997). В частности, для *Eisenia foetida, Tubifex rivulorum, Lumbriculus variegatus* и некоторых других представителей семейства Lumbricidae показано восстановление глотки за счет старой кишки энтодермальной природы. При этом ротовое отверстие и ротовая полость формируются за счет покровного эпителия (Berrill, 1952). Сходным образом происходит восстановление кишки и у почвенной олигохеты *E. japonensis* (Takeo et al., 2008).

У *Lumbriculus inconstans* передние отделы кишечной трубки восстанавливаются за счет инвагинации покровов, однако, интактный кишечный эпителий растет в переднем направлении – навстречу зачатку глотки. Тщательный гистологический анализ показал, что удлинение кишки в переднем направлении происходит за счет пролиферации главных клеток кишки (principal cells). В ходе нормальной жизнедеятельности эти клетки обеспечивают внеклеточное пищеварение и всасывание питательных веществ. В ответ на ампутацию они утрачивают ресничный аппарат, теряют контакт с базальной мембраной и приступают к активным митотическим делениям. Автор специально подчеркивает, что базальные клетки (basal cells), отвечающие за физиологическую регенерацию клеток кишечного эпителия, не принимают участия в ходе посттравматической регенерации (Turner, 1934). Таким образом, в ходе регенерации *Lumbriculus inconstans* происходит дедифференцировка клеток кишечного эпителия, их активное размножение и последующая редифференцировка.

Исследование близкородственного *Lumbriculus variegatus* показало, что основную роль в регенерации передних отделов кишки играет миграция дифференцированных клеток кишки. Прижизненное наблюдение за перемещением энтодермальных клеток в ходе регенерации было осуществлено с использованием флуоресцентной метки к сериновым протеазам. Оказалось, что эти клетки остаются дифференцированными, производят сериновые протеазы в мембрано-связанной форме, перемещаются в составе единого клеточного пласта и формируют глотку. Использование ингибитора сериновых протеаз привело к полному угнетению передней и задней регенерации. Авторы предполагают, что сериновые протеазы могут осуществлять перестройку и локальное разрушение внеклеточного матрикса, что обеспечивает миграцию клеток в бластему, а также прорастание нервных окончаний. Суммируя полученные результаты,

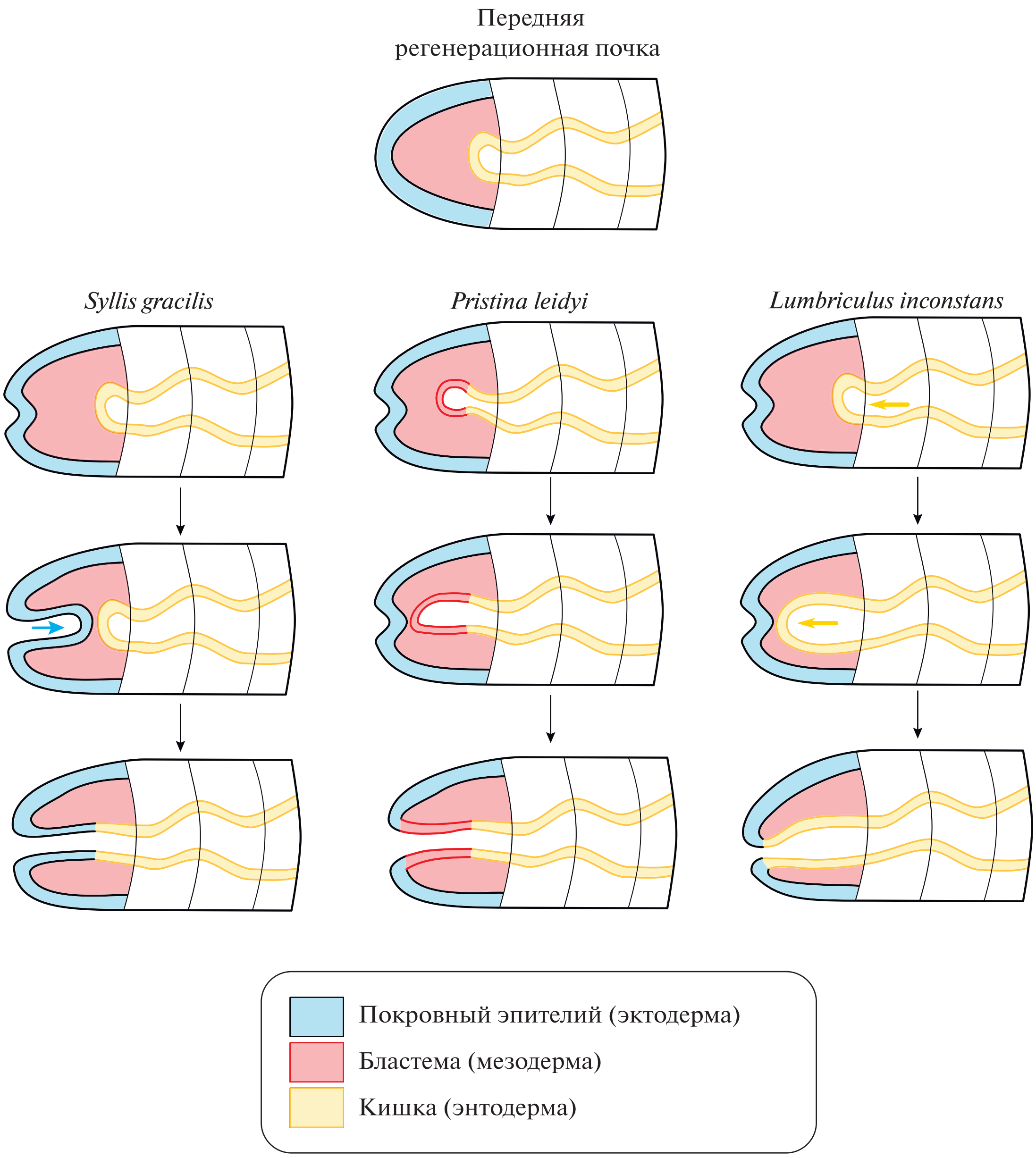

Рис. 2. Способы восстановления кишки в ходе передней регенерации аннелид. На схеме передний конец тела направлен налево. По вертикали схематично изображены этапы восстановления кишки в ходе регенерации *Syllis gracilis* (Errantia), *Pristina leidyi* (Sedentaria, Clitellata), *Lumbriculus inconstans* (Sedentaria, Clitellata). Для всех аннелид общим признаком является восстановление ротового отверстия посредством инвагинации эпителия. У полихет (*S. gracilis*) глотка также восстанавливается за счет инвагинации эктодермального покровного эпителия. Для большинства олигохет характерно восстановление глотки за счет энтодермальной средней кишки (*L. inconstans*). Для *P. leidyi* описано восстановление глотки за счет клеток бластемы, без уточнения их происхождения. Схема составлена на основе данных Berrill (1952) (*S. gracilis*); Bely, Wray (2001) и Zattara, Bely (2011) (*P. leidyi*); и Turner (1934) (*L. inconstans*).

авторы описывают восстановление глотки как морфаллактический процесс (Tweeten, Reiner, 2012).

У *Pristina leidyi* формирование кишки начинается с появления передних ее отделов в центральной части бластемы. При этом ротовое отверстие формируется путем инвагинации покровного эпителия (Zattara, Bely, 2011). Независимое восстановление глотки и ротовой полости в ходе регенерации было подтверждено с использованием молекулярного маркера *Otx* (Bely, Wray, 2001).

Таким образом, восстановление кишки в ходе задней регенерации происходит в целом сходным образом у разных представителей аннелид и обеспечивается клетками интактного кишечного эпителия. Передняя регенерация, напротив, отличается большой вариабельностью (рис. 2). При этом очевидно, что производные энтодермы могут восстанавливаться за счет разных клеточных источников даже в пределах одной особи, обладающей способностью и к передней, и к задней регенерации. Так, например, в ходе передней регенерации *P. leidyi* кишка восстанавливается за счет клеток бластемы, а в ходе задней – за счет пролиферации клеток интактной кишки (Zattara, Bely, 2011). Это указывает на фундаментальные различия в механизмах передней и задней регенерации аннелид. Такие различия действительно были выявлены с использованием РНК-секвенирования и последующего анализа дифференциальной экспрессии генов (Ribeiro et al., 2019).

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЭКТОДЕРМЫ (НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ПОКРОВОВ)

Активно пролиферирующие клетки покровного эпителия около раны являются источником формирования новых покровов (Bely, 2014; Костюченко и др., 2016). Нервная система восстанавливается как за счет клеток покровного эпителия, так и за счет клеток интактной нервной системы.

В ходе регенерации олигохеты *P. leidyi* элементы нервной системы регенерата имеют разное происхождение: нервные ганглии формируются из клеток бластемы, тогда как нервные волокна формируются из выростов интактной нервной цепочки (Zattara, Bely, 2011). В ходе регенерации у олигохеты *E. japonensis* было показано, что еще до проявления всех остальных регенеративных процессов, бластему охватывает сеть нервных волокон (Yoshida-noro et al., 2000). Авторы соотносят эти данные с уже существующей гипотезой об активирующем влиянии нейронов на процесс дедифференцировки клеток, которые, размножаясь, формируют бластему (Thouveny, 1998). Подобное явление отмечено и в ходе регенерации у олигохеты *Stylaria lacustris* и полихеты *A. virens* (Müller, 2004; Козин и др., 2017). Прямая зависимость между наличием аксональных выростов и пролиферативной активностью клеток бластемы была отмечена при изучении задней регенерации у полихеты *C. teleta* (de Jong, Seaver, 2018). Авторы отмечают две вероятные функции нервных волокон в бластеме. Во-первых, нейроны могут выделять некие трофические факторы, стимулирующие клетки к делениям. Во-вторых, по аксонам может происходить миграция клеток, формирующих бластемные массы. О формировании новых элементов нервной системы из клеток бластемы можно судить по экспрессии генов *pax6* и *neurogenin* (Planques et al., 2019). Появление нервных окончаний на поверхности раны у *A. virens* может быть свидетельством того, что в брюшной нервной цепочке новые границы тела устанавливаются уже на первый день регенерации (Козин и др., 2017). Таким образом, роль нервной системы может состоять и в обеспечении глобального паттернирования вдоль переднезадней оси.

В многочисленных исследованиях отмечена регулятивная роль интактной брюшной нервной цепочки в ходе регенерации. Известно, что брюшная нервная цепочка может определять место закладки регенерационной бластемы (Bely, 2014). Было показано, что при отведении нервного тяжа к латеральной стороне тела полихеты *Spirographis spallanzanii*, происходит формирование эктопического головного или хвостового отдела, с сохранением полярности (Короткова, 1997). Паттернирование бластемы вдоль дорсовентральной оси может быть обеспечено сигналами брюшной нервной цепочки, так как при нарушении контакта нервного тяжа с местом ранения, бластема состоит из дорсальных тканей (Boilly et al., 2017).

КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ ФОРМИРОВАНИЯ ГОНАД В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ И БЕСПОЛОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

Некоторые аннелиды способны восстановить гонады в ходе регенерации и бесполого размножения. Для *E. japonensis,* размножающегося фрагментацией, показано, что этот процесс обусловлен миграцией по брюшной нервной цепочке клеток, экспрессирующих гомолог *piwi* (Tadokoro et al., 2006). Эти клетки имеют морфологию недифференцированных клеточных элементов и внешне похожи на необласты. В интактном животном они располагаются на вентральной стороне тела вдоль нервного тяжа. Авторы работы показали, что *piwi*-позитивные клетки не вносят вклад в формирование бластемы, а мигрируют в состав переднего регенерата на более поздней стадии. Попадая в новообразованные 6-й и 7-й сегмент, они делятся и образуют зачатки гонад. Недавно было показано, что линии необластов, *piwi*-позитивных предшественников первично половых клеток и клеток, входящих в состав зоны роста, разделяются сразу после эмбрионального развития *E. japonensis* (Sugio et al., 2008).

Восстановление гонад было показано также в ходе бесполого размножения олигохеты *Pristina leidyi* (Özpolat, Bely, 2015). Механизм этого процесса сходен с таковым у *E. japonensis* и так же обусловлен миграцией *piwi*-позитивных клеток.

Кроме того, формирование гонад в новообразованных задних сегментах показано у полихеты *Capitella teleta*, которая размножается исключительно половым путем (Giani et al., 2011). В отличие от *E. japonensis*, у *Capitella teleta piwi*-позитивные клетки в большом количестве присутствуют в бластеме, начиная с самых ранних стадий ее закладки.

Стоит отметить, что из приведенных примеров только у *E. japonensis* была показана возможность становления гонад *de novo* в регенерирующем фрагменте, не содержащем семенников и яичников. В случае *P. leidyi* половые органы входили в состав материнской особи, а у *C. teleta* ампутировали не все сегменты, несущие гонады.

Интересно, что, несмотря на стереотипный характер эмбрионального развития, для некоторых полихет показана способность к эмбриональной регуляции. В недавнем исследовании (Dannenberg, Seaver, 2018) продемонстрировано восстановление линии половых клеток после удаления их предшественников на стадии ранних зародышей *C. teleta*. Неожиданно, удаление соответствующих клеток квадранта D приводило к эктопической экспрессии генов *CapI-vasa* и *CapI-nanos* в других тканях личинок. Более того, через две недели после метаморфоза все животные, развившиеся из прооперированных зародышей, имели сформированные кластеры мультипотентных клеток, и почти все, достигнув взрослого состояния, приступали к половому размножению. Таким образом, компенсация предшественников такой особой клеточной популяции как первично половые клетки возможна в результате эмбриональной регуляции – разновидности регенерации.

МОРФАЛЛАКСИС КАК ЭЛЕМЕНТ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА

Несмотря на значительную роль пролиферации клеток в ходе регенерации аннелид, многими авторами описан процесс морфаллаксиса. В ходе морфаллаксиса активных клеточных делений не происходит, бластема не образуется, а восстановление утраченных участков тела происходит путем реорганизации уже имеющихся структур (Короткова, 1997). В большинстве случаев наблюдается сочетание эпиморфоза и морфаллактических перестроек, поэтому некоторые авторы отмечают условность такого разделения восстановительных процессов (Короткова, 1997). Морфаллаксис может происходить на разных уровнях (молекулярном, тканевом, органном или на уровне целых участков тела) и, вероятно, является необходимым условием полноценной регенерации (Костюченко, Козин, 2020).

Морфаллаксис на молекулярном уровне обеспечивает два важных события: восстановление позиционной информации после проведения ампутации и, соответственно, запуск адекватного повреждению регенерационного ответа; интеграция сформированного регенерата в существующую систему координат.

Вероятными участниками процесса поддержания и восстановления позиционной информации после ампутации являются *Hox*-гены (Novikova et al., 2013). Во время роста ювенильных червей *A. virens* координированный паттерн экспрессии *Hox*-генов не приводит к спецификации сегментов (так как тело *A. virens* не имеет тагм), а обеспечивает позиционную информацию вдоль переднезадней оси (Kulakova et al., 2007). Во время задней регенерации транскрипция *Hox*-генов происходит в два этапа. Во время ранней фазы (начиная с 48-ми часов до стадии дифференцировки бластемы) происходит реорганизация существующего *Hox*-кода в соответствии с новой задней границей тела. Вторая фаза экспрессии связана с паттернированием бластемы и формирующихся сегментов. Авторы также предлагают механизм запуска молекулярно-клеточных событий в ответ на ампутацию. Тканевым событием, инициирующим процесс регенерации, по их предположению является контакт кишечного (энтодермального) и покровного (эктодермального) эпителиев, происходящий во время заживления раны. Место контакта двух клеточных пластов становится своего рода организатором, посылающим морфогенетический сигнал. Этот сигнал индуцирует реорганизацию позиционной информации, что запускает клеточный ответ регенерации (дедифференцировка клеток, их пролиферация, восстановление зоны роста и недостающих сегментов). Авторы предполагают, что гомолог гена *caudal* является позиционным маркером, чувствительным к сигналу организатора и инициирующим перестройку разметки тела вдоль переднезадней оси (Novikova et al., 2013). Такой сценарий согласуется с данными о важности взаимодействия кишечного и покровного эпителиев для репаттернирования тела в ходе регенерации, полученными в экспериментах на аннелидах и других животных (Короткова, 1997).

Результаты, полученные Е.Л. Новиковой и коллегами (Novikova et al., 2013), отчасти подтверждаются аналогичным исследованием, проведенном на родственной полихете *P. dumerilii* (Pfeifer et al., 2012). Авторы этой работы проанализировали паттерн экспрессии *Hox*-генов только во вновь сформированных тканях. Они предполагают, что ансамбль генов *Hox*-кластера в тканях регенерата *P. dumerilii* обеспечивает паттернирование нервной системы новых сегментов.

Тем не менее, механизм восстановления позиционной информации посредством генов *Hox*-кластера не является универсальным. Ампутация задних сегментов полихеты *C. teleta* не приводит к сдвигу границ экспрессии большинства *Hox*-генов в интактных сегментах. Передние границы экспрессии только трех генов (*CapI-lox2*, *CapI-lox4* и *CapI-Post2*) сдвигаются на один сегмент вперед. По-видимому, разметка тела *C. teleta* остается стабильной в ходе задней регенерации (de Jong, Seaver, 2016).

Значительные морфаллактические перестройки кишки в ходе передней и задней регенерации обнаружены у олигохеты *E. japonensis*. С использованием молекулярных маркеров *tuba*, *mino* и *horu* авторы показали, что после регенерации утраченных сегментов по типу эпиморфоза, происходит восстановление исходных пропорций кишечного тракта всего животного, то есть морфаллаксис. Таким образом, регенерат оказывается интегрирован в единую систему организма (Takeo et al., 2008). В тоже время, у олигохет из рода *Pristina* только часть кишки, расположенная в двух ближайших к ране старых сегментах, претерпевает трансформацию в новый желудок в ходе передней регенерации (Zattara, Bely, 2011; Костюченко и др., 2016).

Морфаллаксис может затрагивать не только системы, но и отдельные метамерные органы в ходе регенерации. Например, в двух интактных сегментах тела олигохеты *P. leidyi*, прилежащих к восстановленным головным сегментам, происходит деградация метанефридиев. Вероятно, это связано с приобретением этими сегментами нового позиционного значения (Zattara, Bely, 2011).

Существуют, однако, и примеры значительных перестроек сегментов в ходе регенерации. Восстановление передних сегментов *Sabella melanostigma* протекает с образованием регенерационной бластемы, из которой формируются простомиум, перистомиум и два передних грудных сегмента. Остальные грудные сегменты восстанавливаются за счет перестройки брюшных сегментов. Процесс морфаллаксиса в данном случае можно описать как смену дорсовентральной полярности сегментов. Эта трансформация затрагивает производные всех трех зародышевых листков: кишечник трансформируется в желудок, параподиальные структуры перестраиваются в соответствии со сменой дорсовентральной оси, а кроме того, появляются свойственные грудным сегментам метанефридии. При этом восстановление сегментов в ходе задней регенерации происходит по типу эпиморфоза, без явных признаков морфаллаксиса. После ампутации на уровне грудных сегментов сначала восстанавливаются недостающие грудные сегменты, а затем — брюшные. Учитывая антипараллельность дорсовентральной оси грудных и брюшных сегментов, естественно предположить уникальный для сабеллид механизм инверсии задней зоны роста в ходе регенерации (Berrill, 1978).

ПЕРСПЕКТИВЫ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ

Несмотря на значительный прогресс в обнаружении молекулярных участников, поиск последних производится, как правило, методами иммуноцитохимии или гибридизации *in situ*, что не позволяет получать массивные данные. Одной из самых ранних работ, имевших целью получение информации о большом количестве генов, экспрессирующихся в ходе регенерации у *E. japonensis*, было исследование Миохара с коллегами (Myohara et al., 2006). На основе кДНК ими было клонировано большое количество генов. Среди этих 165 генов оказалось немало ферментов, однако почти для половины генов не были найдены ортологи.

Очевидно, переход к новым технологиям, например, к сравнительной трансриптомике, может существенно ускорить наше понимание основ регенерации. Так в недавно опубликованной работе (Ribeiro et al., 2019) показана дифференциальная экспрессия генов при регенерации двух вдов аннелид: *Sphaerosyllis hystrix* (4771 генов) и *Syllis gracilis* (1997), способных к ограниченной и полноценной передней регенерации, соответственно. Для обоих видов сравнительный транскриптомный анализ показал сходство экспрессии генов во время задней регенерации и регулярного роста, тогда как передняя регенерация характеризовалась активацией нескольких иных генов. Прицельный поиск был проведен по 71 гену, экспрессия которых была ранее показана при регенерации других аннелид (см. выше). Большинство из этих генов были идентифицированы в транскриптомах (57 для *S. hystrix* и 54 для *S. gracilis*). Кроме того, были обнаружены множественные изоформы генов, например, *paics* и *slit* для *S. hystrix* или *even-skipped*, *FGFR*, *gcs1a*, *glutamine synthetase*, *hedgehog*, *JNK*, *Msx*, *piwi1*, *Sfrp1/2/5* и *Wnt* для *S. gracilis*, что может свидетельствовать о наличии нескольких гомологов. *JNK*, *rup2* и *paics* у *S. hystrix*, а также β-*catenin*, *cycB3*, *glutamine synthetase*, *paics*, *PL10*, *brat*, *elav*, *FGFR*, *gcs1a*, *slit*, *Hox7*, *Lox2* у *S. gracilis* оказались среди генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе передней регенерации. Таким образом, в ходе передней регенерации у двух представителей *Syllidae* показано участие целого набора генов, ответственных за клеточную пролиферацию, поддержание стволового и мультипотентного статуса клеток, развитие нервной системы и формирование позиционной информации.

Интересно, что в обоих транскриптомах были идентифицированы гомологи *Ej-rup 1–5* (гены, регулирующие регенерацию *E. japonensis* (Myohara et al., 2006)). Однако только у *S. hystrix* один из них (*Shy-rup2*) экспрессировался на более высоком уровне в ходе передней регенерации (в сравнении с нормальным ростом). Функция этого гена не ясна, но *Ej-rup2* был обнаружен в эпидермальных клетках бластемы во время передней регенерации и может быть геном, специфичным для регенерации (Myohara et al., 2006; Ribeiro et al., 2019).

В другой работе на олигохете *Eisenia fetida* было показано, что менее чем сто генов демонстрировали существенную дифференциальную экспрессию в ходе всего периода задней регенерации. Однако при этом, в сравнении с интактными тканями, в тканях регенерата значительное количество генов прекращали экспрессироваться. По мнению авторов, такое сокращение набора активных генов связано с недифференцированным состоянием большинства клеток регенерационной почки (Bhambri et al., 2018). Транскриптомный анализ показал не только существенный уровень транскриптов, кодирующих SOX4, Brachyury, Even-skipped, участников сигнальных путей (FGF, BMP2, WNT), факторы цилиогенеза, развития нервной системы и роста аксонов, но и некодирующих РНК, включая микроРНК (Bhambri et al., 2018).

Итак, согласно приведенным из литературы сведениям, аннелиды в большинстве своем обладают выраженными регенеративными способностями. Однако механизмы восстановления утраченных частей тела могут существенно отличаться даже у близкородственных видов. Несмотря на большое количество подробных исследований процесса регенерации, вопрос о клеточных источниках восстановления мезодермальных производных остается открытым. Очевидно, что для полного раскрытия механизмов регенерации с учетом всего разнообразия биологических процессов, способствующих как сохранению, так и ограничению способностей регенерировать различные ткани, органы и части тела, требуются комплексные исследования. Технические условия для реализации таких проектов уже созданы. Привлечение современных методов морфологического анализа, в том числе на основе трансгенных моделей, методов геномики, транскриптомики, секвенирования отдельных клеток и различных способов функционального анализа могут позволить уже в ближайшем будущем ответить на многие вопросы относительно регенерации.

Исследования проведены при финансовой поддержке грантов РФФИ 19-04-01111-а и 18-34-00962-мол-а.

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

Козин В.В., Бабаханова Р.А., Костюченко Р.П. Участие МАР-киназного сигналинга в спецификации клеточных линий и дорсовентральной оси у примитивной гастроподы *Testudinalia testudinalis* (Patellogastropoda, Mollusca) // Онтогенез. 2013. Т. 44. № 1. С. 42–56.

Козин В.В., Филиппова Н.А., Костюченко Р.П. Восстановление нервной и мышечной системы в ходе регенерации полихеты *Alitta virens* (Annelida: Nereididae) // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 3. С. 234–247.

Короткова Г.П. Регенерация животных. С-Пб.: изд-во С.-Петерб. ун-та, 1997. 480 с.

Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Закономерности формирования прототроха в эмбриональном развитии полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 91–99.

Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Особенности развития изолированных бластомеров полихеты *Alitta virens* // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 3. С. 275–280.

Костюченко Р.П., Козин В.В. Морфаллаксис *versus* эпиморфоз? Клеточные и молекулярные аспекты регенерации и бесполого размножения у аннелид // Изв. РАН. Сер. биол. 2020. Т. 47. № 3. (в печати). https://doi.org/10.31857/S0002332920030042

Костюченко Р.П., Козин В.В., Купряшова Е.Е. Регенерация и бесполое размножение у аннелид: клетки, гены и эволюция // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. V. 43. № 3. P. 231–241.

Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 35–50.

Харин А.В., Загайнова И.В., Костюченко Р.П. Формирование зоны паратомии у пресноводных олигохет // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 424–437.

Bely A.E. Early events in annelid regeneration: a cellular perspective // Integr. Comp. Biol. 2014. V. 54. № 4. P. 688–699.

Bely A.E., Sikes J.M. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 1464–1469.

Bely A.E., Wray G.A. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from *engrailed*- and *orthodenticle*-class gene expression // Development. 2001. V. 128. № 14. P. 2781–2791.

Berrill N.J. Regeneraton and budding in worms // Biol. Rev. 1952. V. 27. № 4. P. 401–438.

Berrill N.J. Induced segmental reorganization in sabellid worms // J. Embryol. Exp. Morphol. 1978. V. 47. P. 85–96.

Bhambri A., Dhaunta N., Patel S.S., Hardikar M. et al. Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration // PLoS One. 2018. V. 13. № 9. e0204234.

Bilello A.A., Potswald H.E. A cytological and quantitative study of neoblasts in the naid *Ophidonais serpentina* (Oligochaeta) // Wilhelm Roux. Arch. Entwickl. Mech. Org. 1974. V. 174. № 3. P. 234–249.

Boilly B., Boilly-marer Y., Bely A.E. Regulation of dorso-ventral polarity by the nerve cord during annelid regeneration: A review of experimental evidence // Regeneration. 2017. V. 4. № 2. P. 54–68.

Cornec J.-P., Cresp J., Delye P., Hoarau F., Reynaud G. Tissue responses and organogenesis during regeneration in the oligochete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clap.) // Can. J. Zool. 1987. V. 65. № 2. P. 403–414.

Dannenberg L.C., Seaver E.C. Regeneration of the germline in the annelid *Capitella teleta* // Dev. Biol. 2018. V. 435. P. 26–40.

de Jong D.M., Seaver E.C. Investigation into the cellular origins of posterior regeneration in the annelid *Capitella teleta* // Regeneration. 2018. V. 5. № 1. P. 61–77.

de Jong D.M., Seaver E.C. A Stable thoracic *Hox* code and epimorphosis characterize posterior regeneration in *Capitella teleta* // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. e0149724.

de Rosa R., Prud'homme B., Balavoine G. caudal and *even-skipped* in the annelid *Platynereis dumerilii* and the ancestry of posterior growth // Evol. Dev. 2005. V. 7. № 6. P. 574–587.

Dill K.K., Seaver E.C. Vasa and *nanos* are coexpressed in somatic and germ line tissue from early embryonic cleavage stages through adulthood in the polychaete *Capitella* sp. I // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218. № 9. P. 453–463.

Dupin F., Coulon J., Parco Y. Le, Fontes M., Thouveny Y. Formation of the extracellular matrix during the epimorphic anterior regeneration of *Owenia fusiformis*: autoradiographical and in situ hybridization studies // Int. J. Dev. Biol. 1991. V. 35. № 2. P. 109–119.

Fontés M., Coulon J., Delgrossi M.H., Thouveny Y. Muscle dedifferentiation and contractile protein synthesis during post-traumatic regeneration by *Owenia fusiformis* (polychaeta annelid) // Cell Differ. 1983. V. 13. № 4. P. 267–282.

Gazave E., Behague J., Laplane L., Guillou A., Preau L., Demilly A., Balavoine G., Vervoort M. Posterior elongation in the annelid *Platynereis dumerilii* involves stem cells molecularly related to primordial germ cells // Dev. Biol. 2013. V. 382. P. 246–267.

Giani V.C., Yamaguchi E., Boyle M.J., Seaver E.C. Somatic and germline expression of *piwi* during development and regeneration in the marine polychaete annelid *Capitella teleta* // Evodevo. 2011. V. 2. № 10. P. 1–18.

Hill S.D. Origin of the regeneration blastema in polychaete annelids // Integr. Comp. Biol. 1970. V. 10. № 2. P. 101–112.

Juliano C.E., Swartz S.Z., Wessel G.M. A conserved germline multipotency program // Development. 2010. V. 137. № 24. P. 4113–4126.

Kostyuchenko R.P., Kozin V.V., Filippova N.A., Sorokina E.V. FoxA expression pattern in two polychaete species, *Alitta virens* and *Platynereis dumerilii*: Examination of the conserved key regulator of the gut development from cleavage through larval life, postlarval growth, and regeneration // Dev. Dyn. 2019. V. 248. № 8. P. 728–743.

Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P. Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete *Alitta virens* (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers *Twist, Mox, Evx* and functional role for MAP kinase signaling // Mech. Dev. 2016. V. 140. P. 1–11.

Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. Vasa, PL10, and *Piwi* gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens* // Dev. Genes Evol. 2015. V. 225. № 3. P. 129–138.

Kulakova M., Bakalenko N., Novikova E., Cook C.E., Eliseeva E., Steinmetz P.R.H., Kostyuchenko R.P., Dondua A., Arendt D., Akam M., Andreeva T. Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa) // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 1. P. 39–54.

Lanza A.R, Seaver E.C. An organizing role for the TGF-β signaling pathway in axes formation of the annelid *Capitella teleta* // Dev. Biol. 2018. V. 435. P. 26–40.

Müller M.C.M. Nerve development, growth and differentiation during regeneration in *Enchytraeus fragmentosus* and *Stylaria lacustris* (Oligochaeta) // Dev. Growth Differ. 2004. V. 46. № 5. P. 471–478.

Myohara M. What role do annelid neoblasts play? A comparison of the regeneration patterns in a neoblast-bearing and a neoblast-lacking Enchytraeid Oligochaete // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. e37319.

Myohara M., Niva C.C., Lee J.M. Molecular approach to annelid regeneration: cDNA subtraction cloning reveals various novel genes that are upregulated during the large-scale regeneration of the oligochaete, *Enchytraeus japonensis* // Dev. Dyn. 2006. V. 235. P. 2051–2070.

Myohara M., Yoshida-noro C., Kobari F. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: A new material for regeneration study // Dev. Growth Differ. 1999. V. 41. № 5. P. 549–555.

Nakamoto A., Nagy L.M., Shimizu T. Secondary embryonic axis formation by transplantation of D quadrant micromeres in an oligochaete annelid // Development. 2010. V. 138. P. 283–290.

Newmark P.A., Alvarado A.S. Regeneration in Planaria // eLS. 2001. P. 1–7.

Novikova E.L., Bakalenko N.I., Nesterenko A.Y., Kulakova M.A. Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta* (*Nereis*) virens (Annelida, Lophotrochozoa) // Evodevo. 2013. V. 4. № 14.

Okada Y.K. Regeneration and fragmentation in the Syllidian Polychaetes // W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik. 1929. V. 115. № 3. P. 542–600.

Oyama A., Shimizu T. Transient occurrence of *vasa*-expressing cells in nongenital segments during embryonic development in the oligochaete annelid *Tubifex tubifex* // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 10. P. 675–690.

Oyama A., Yoshida H., Shimizu T. Embryonic expression of *p68*, a DEAD-box RNA helicase, in the oligochaete annelid *Tubifex tubifex* // Gene Expr. Patterns. 2008. V. 8. № 6. P. 464–470.

Özpolat B.D., Bely A.E. Gonad establishment during asexual reproduction in the annelid *Pristina leidyi* // Dev. Biol. 2015. V. 405. № 1. P. 123–136.

Paulus T., Müller M.C.M. Cell proliferation dynamics and morphological differentiation during regeneration in *Dorvillea bermudensis* (Polychaeta, Dorvilleidae) // J. Morphol. 2006. V. 267. № 4. P. 393–403.

Pfeifer K., Dorresteijn A.W.C., Fröbius A.C. Activation of Hox genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* // Dev. Genes Evol. 2012. V. 222. № 3. P. 165–179.

Planques A., Malem J., Parapar J., Vervoort M., Gazave E. Morphological, cellular and molecular characterization of posterior regeneration in the marine annelid *Platynereis dumerilii* // Dev. Biol. 2019. V. 445. № 2. P. 189–210.

Randolph H. The regeneration of the tail in Lumbriculus // J. Morphol. 1892. V. 7. № 3. P. 317–344.

Ribeiro R.P., Ponz-Segrelles G., Bleidorn C., Aguado M.T. Comparative transcriptomics in Syllidae (Annelida) indicates that posterior regeneration and regular growth are comparable, while anterior regeneration is a distinct process // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. P. 1–13.

Stocum D.L. Regenerative Biology and Medicine. 2 ed. Amsterdam: Elsevier Science Publ. Co. Inc., 2012. 474 p.

Sugio M., Takeuchi K., Kutsuna J., Tadokoro R., Takahashi Y., Yoshida-noro C., Tochinai S. Exploration of embryonic origins of germline stem cells and neoblasts in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida) // Gene Expr. Patterns. 2008. V. 8. № 4. P. 227–236.

Sugio M., Yoshida-noro C., Ozawa K., Tochinai S. Stem cells in asexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelid): Proliferation and migration of neoblasts // Dev. Growth Differ. 2012. V. 54. № 4. P. 439–450.

Tadokoro R., Sugio M., Kutsuna J., Tochinai S. Early segregation of germ and somatic lineages during gonadal regeneration in the annelid *Enchytraeus japonensis* // Curr. Biol. 2006. V. 16. № 10. P. 1012–1017.

Takeo M., Yoshida-noro C., Tochinai S. Morphallactic regeneration as revealed by region-specific gene expression in the digestive tract of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida) // Dev. Dyn. 2008. V. 237. № 5. P. 1284–1294.

Takeo M., Yoshida-noro C., Tochinai S. Functional analysis of *grimp*, a novel gene required for mesodermal cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete) // Int. J. Dev. Biol. 2010. V. 160. P. 151–160.

Thouveny Y. Regeneration through phylogenesis // Cell. Mol. Basis Regen. 1998. P. 9–44.

Turner C.D. The effects of X-rays on posterior regeneration in *Lumbriculus inconstans* // J. Exp. Zool. 1934. V. 68. № 1. P. 95–119.

Tweeten K.A., Anderson A. Analysis of cell proliferation and migration during regeneration in *Lumbriculus variegatus* (Clitellata: Lumbriculidae) // Bios. 2008. V. 79. № 4. P. 183–190.

Tweeten K.A., Reiner A. Characterization of serine proteases of *Lumbriculus variegatus* and their role in regeneration // Invertebr. Biol. 2012. V. 131. № 4. P. 322–332.

Wanninger A. (Ed.) Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 2: Lophotrochozoa (Spiralia). Vienna: Springer Vienna, 2015. 289 p.

Yoshida-noro C., Myohara M., Kobari F., Tochinai S. Nervous system dynamics during fragmentation and regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida) // Dev. Genes Evol. 2000. V. 210. № 6. P. 311–319.

Yoshida-noro C., Tochinai S. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida) // Dev. Growth Differ. 2010. V. 52. № 1. P. 43–55.

Zattara E.E., Bely A.E. Evolution of a novel developmental trajectory: fission is distinct from regeneration in the annelid *Pristina leidyi* // Evol. Dev. 2011. V. 13. № 1. P. 80–95.

Regeneration in Annelids: Cellular Sources, Tissue Remodeling, and Differential Gene Expression

D. D. Nikanorova[1], E. E. Kupriashova[1], and R. P. Kostyuchenko[1,]*

[1]St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru*

Recent studies have shown that, despite stereotypical cleavage, annelids demonstrate the ability to embryonic regulation, including the formation of germline cells. However, the widest variety of regulative processes is presented in the post-larval development of annelids. The ability to regenerate, which is probably an ancestral feature, manifests itself differently among these animals. Some species are unable to regenerate lost segments. However, most species replace lost posterior body parts, many are able to re-establish missing head segments and structures, and some develop the entire body *de novo* even on the basis of one or two segments. Most of the regenerated structures are formed due to a set of undifferentiated cells arising from the division of dedifferentiated and/or stem cells. Moreover, the regeneration process often involves remodeling of surviving body fragments, and may thus be associated not only with local changes, but also require a reaction at the level of the whole organism. In this review, we summarize many recent studies on the molecular and cellular mechanisms of regeneration in annelids. A special attention is paid to the regeneration of the digestive and nervous systems, integuments, the participation of stem and undifferentiated cells in the development of blastema and in replacing of the lost gonads. Accumulation and analysis of recent findings about the diversity of cellular sources and mechanisms of annelid regeneration can shed light on the most evolutionarily conserved programs for maintaining regeneration ability and processes leading to the loss (limitation) of one of the ancestral features of animals.

Keywords: regeneration, dedifferentiation, multipotent cells, stem cells, germ cells, gene expression, digestive system, nervous system, tissue remodeling, annelids

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 193–209

ОБЗОРЫ

УДК 591

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАННЕГО РАЗВИТИЯ КОНЕЧНОГО МОЗГА, КАК ОТРАЖЕНИЕ ИСТОРИИ ПОЯВЛЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИИ ЭТОГО УНИКАЛЬНОГО ОТДЕЛА ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2020 г. А. В. Байрамов[a], *, Г. В. Ермакова[a], А. Г. Зарайский[a]

[a]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997 Россия

*e-mail: andrbayr@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2020 г.
После доработки 18.02.2020 г.
Принята к публикации 21.02.2020 г.

Одним из важнейших ароморфозов в эволюции позвоночных стало появление сложноструктурированного конечного мозга или теленцефалона – отдела переднего мозга, который, развиваясь и совершенствуясь, обеспечил возможность реализации высших форм нервной деятельности, наблюдаемых у животных и человека. Закладка конечного мозга происходит на самых ранних этапах онтогенеза позвоночных, когда передняя часть нервной трубки дифференцируется на три мозговых пузыря: прозенцефалон, как зачаток будущего переднего мозга, мезенцефалон – будущий средний мозг и ромбэнцефалон – будущий задний мозг. Передний мозг в дальнейшем дифференцируется, формируя конечный мозг (теленцефалон) и промежуточный мозг (диэнцефалон). Развитие структур и отделов мозга модулируется экспрессией соответствующих регуляторных генов, кодирующих транскрипционные факторы и сигнальные молекулы. Вопросы появления в эволюции и онтогенеза конечного мозга, являясь на сегодняшний день одними из центральных в современной биологии развития, на молекулярном уровне остаются до сих пор слабо изученными. В последнее время при изучении эволюционных механизмов, обеспечивших появление у позвоночных конечного мозга большое внимание уделяется наиболее эволюционно древним группам позвоночных, таким как круглоротые (миноги и миксины) и ближайшим родственникам позвоночных – оболочникам и бесчерепным (ланцетникам). Особый интерес в этих исследованиях представляют круглоротые, поскольку именно у представителей этой группы конечный мозг впервые в эволюции появляется в виде отдельной морфологической структуры и есть основания полагать, что у них могли сохраниться паттерны экспрессии и регуляторные механизмы, характерные для предков позвоночных. В данной обзорной статье мы суммируем и анализируем накопленные в последние годы данные исследований генетических механизмов раннего развития конечного мозга у позвоночных и результаты поиска гомологов этой структуры у родственных позвоночным групп хордовых – бесчерепных и оболочников.

Ключевые слова: конечный мозг, теленцефалон, прозенцефалон, нейральная индукция, бесчерепные, круглоротые, миноги, позвоночные, развитие конечного мозга, ранняя зародышевая дифференцировка

DOI: 10.31857/S0475145020030052

ВВЕДЕНИЕ

Работы, посвященные исследованию конечного мозга позвоночных, как правило, затрагивают один из следующих аспектов этой проблемы:

1. Исследование деталей строения и молекулярных механизмов развития конечного мозга, у наиболее эволюционно продвинутых групп позвоночных, таких как млекопитающие и, в первую очередь, человек.

2. Исследование индукционных механизмов, лежащих в основе дифференцировки конечного мозга в онтогенезе позвоночных.

3. Исследование эволюционных предпосылок появления конечного мозга, как уникальной структуры позвоночных и прослеживание путей развития этой структуры у разных групп позвоночных.

Безусловно, исследования механизмов развития и дифференцировки конечного мозга млекопитающих имеют очевидную важность как с фундаментальной, так и с практической точек зрения, и это направление находится в фокусе внимания многих исследовательских групп. Современное положение дел по этой теме очень подробно и обстоятельно освещено в ряде обзоров – Nord et al., 2015; Nomura et al., 2014; Medina, Abellan, 2009; Takahashi, Liu, 2006.

Не пытаясь объять необьятное, в настоящем обзоре, мы, кратко рассмотрев актуальные данные о молекулярных механизмах первичной дифференцировки зачатка конечного мозга, как части центральной нервной системы (ЦНС) позвоночных, сконцентрируемся преимущественно на вопросах появления и развития конечного мозга позвоночных на ранних этапах их эволюционного пути. Один из вопросов, неизбежно возникающих в этом контексте состоит в том, чтобы понять на каком этапе эволюции конечный мозг впервые появляется. Естественным путем в решении этого вопроса видится исследование особенностей строения конечного мозга у современных представителей наиболее эволюционно древних групп позвоночных, таких как бесчелюстные, а также поиск гомологий в строении отделов ЦНС у родственных позвоночным представителей типа хордовых – бесчерепных и оболочников. Многие данные по этим группам получены в буквальном смысле в последние годы, что делает актуальной попытку их суммирования и анализа накопленных результатов.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЗАЧАТКА КОНЕЧНОГО МОЗГА В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОЗВОНОЧНЫХ

По ходу эволюционного развития разных групп позвоночных, строение их головного мозга менялось под воздействием факторов окружающей среды, обеспечивая приспособленность животных к меняющимся экологическим обстоятельствам. В результате, конечный мозг стал центром мультимодальной сенсорной организации, контролирующим богатый поведенческий репертуар животных и человека.

Дифференцировка зачатка ЦНС у позвоночных начинается на ранних этапах онтогенеза в ходе нейральной индукции. Исследования показывают, что нейроэктодермальная пластинка, представляющая собой первичный зачаток будущей ЦНС уже стратифицирована на молекулярном уровне по передне-задней оси. Согласно просомерической модели, описывающей дифференцировку головного отдела нервной трубки по передне-задней оси, первичный план морфологического строения включает подразделение зачатка будущего мозга на передний, средний и задний отделы, с примыкающим к ним каудально спинным отделом (Puelles, Rubenstein, 2015). В дальнейшем эти отделы подразделяются на более мелкие подотделы под воздействием сигналов так называемых "вторичных организаторов". В качестве таких организаторов выступают расположенные вентральней нервной пластинки мезодермальные нотохорд и прехордальная пластинка, передний край нервной пластинки, ограниченная внутриталамическая зона (*zona limitans intrathalamica*, ZLI), расположенная между таламусом и преталамусом и перешеек или истмус-организатор (isthmic organizer, IsO), на границе среднего и заднего отделов мозга (mid-hindbrain border, MHB) (рис. 1). В результате первичный задний отдел подразделяется на метэнцефалон, включающий мозжечок и мост и миеленцефалон (*medulla oblongata*), средний отдел остается единым, а передний домен разделяется на промежуточный и конечный отделы мозга. Дорсо-вентрально промежуточный мозг в свою очередь подразделяется на таламус и гипоталамус, а конечный мозг – на кору и подкорковую зону (Yamamoto et al., 2017).

В качестве морфогенов вторичных организаторов выступают такие факторы как Shh и Fgf8/Wnt1, вовлеченные в дифференцировку переднего, промежуточного, среднего и части нейромеров заднего отделов (Viera et al., 2010; Danesin, Houart, 2012). В поперечном сечении в нервной трубке как правило выделяют четыре сегмента – крыша (roof plate), дорсальный сегмент (alar plate), вентральный сегмент (basal plate) и дно (floor plate) (рис. 1). Дорсовентральная дифференцировка зачатка нервной системы происходит рано, уже на стадии нервной пластинки, и до его сворачивания в нервную трубку выглядит как стратификация пластинки в медиолатеральной плоскости.

Конечный мозг морфологически впервые обособляется в качестве выроста прозенцефалона (зачатка переднего мозга позвоночных) на переднем конце нервной трубки. На этот момент, морфологически будущий конечный мозг представляет собой тонкий, по всей видимости, единообразный пласт нейроэпителиальных стволовых клеток, который, в ходе последующих делений дает начало нейронам и глиальным элементам коры больших полушарий (Taverna et al., 2014). Строение конечного мозга у позвоночных консервативно и у представителей всех классов он включает в себя два отдела: дорсальный (кора или паллиум) и вентральный (подкорковая зона или субпаллиум). Кора состоит из четырех отделов: медиальный паллиум (будущий гиппокамп), дорсальный паллиум (образующий кору), латеральный паллиум (будущая обонятельная кора и часть миндалины) и вентральный паллиум (будущая ограда мозга и часть миндалины). Подкорковая зона состоит из telencephalic stalk, латерального и медиального бугорка, которые дают начало базальным ганглиям стриатуму и паллидуму (Bachy et al., 2002).

Базальные ганглии, продуцирующие ингибиторные ГАМК-эргические нейроны – это высококонсервативные структуры, которые по данным комплексных исследований, включающих анализ клеточной морфологии и экспрессии нейротранс-

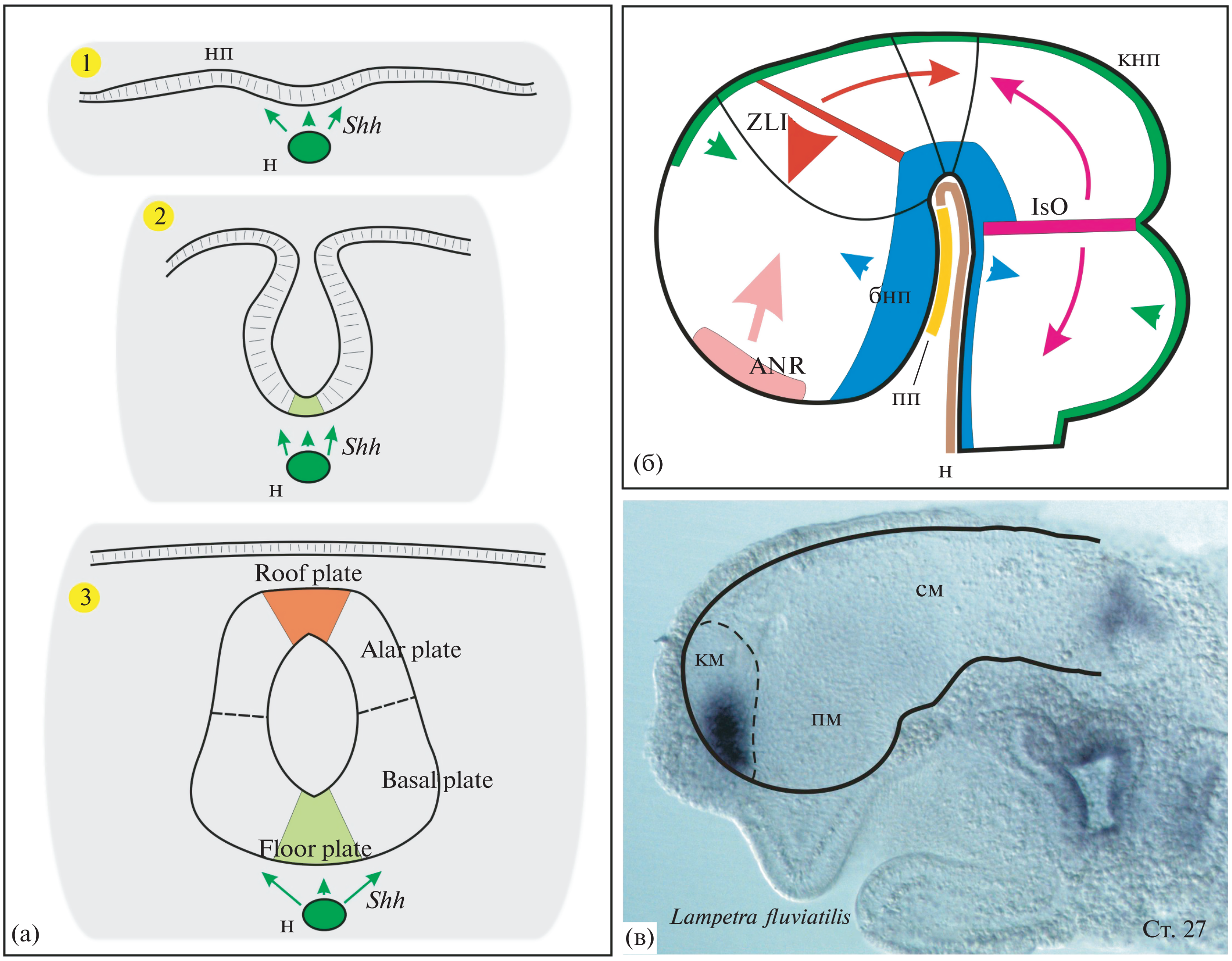

Рис. 1. а – нейральная индукция нервной пластинки, ее последующее сворачивание в нервную трубку и дорсо-вентральная дифференцировка (поперечое сечение). н – нотохорд, нп – нервная пластинка. б – схема расположения организационных центров (“вторичных организаторов”) в зачатке головного мозга позвоночных. ANR – передний край нейрального зачатка (anterior neural ridge), ZLI – *zona limitans interthalamica*, IsO – *isthmus organizer* перешеек или истмусовый организатор, бнп – базальная часть нервной пластинки, кнп – крыша нервной пластинки (roof plate), н – нотохорд, пп – прехордальная пластинка. в – расположение отделов мозга на сагиттальном срезе головного отдела зародыша европейской речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) на стадии 27 (по Tahara, 1988), км – конечный мозг, пм – промежуточный мозг, см – средний мозг.

миттеров генов раннего развития, были описаны у всех ныне живущих позвоночных. Клетки зачатка дорсального отдела – коры – являются источником активаторных глутаматэргических нейронов. При этом, в отличие от консервативных стриатума и паллидума, структуры коры значительно более эволюционно лабильны у разных групп позвоночных (Briscoe, Ragsdale, 2019).

Пространственная дифференцировка конечного мозга регулируется организационными центрами и транскрипционными факторами, которые наиболее полно исследованы у млекопитающих (Hebert, Fishell, 2008; Kiecker, Lumsdem, 2012).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КОНЕЧНОГО МОЗГА

Принятая на сегодняшний день модель индукции конечного мозга включает в себя следующие постулаты:

– Нервная пластинка формируется из наивной эктодермы путем индукции, для которой требуется ингибирование BMP и TGF-beta сигнальных каскадов.

– Индуцированная нервная ткань изначально ориентирована на дифференцировку по переднему (антериорному) пути (так называемая модель индукции “по умолчанию”).

– Поддержание возможности дифференцировки клеток по антериорному типу зависит от активности антагонистов задних сигналов, которые, в свою очередь, направляют дифференцировку по постериорному типу (Andoniadou, Martinez-Barbera, 2013).

Классическая модель нейральной индукции, включая понятие “организатора” берет свое начало с экспериментов Г. Шпеманна и Х. Мангольд по индукции дополнительного комплекса осевых структур при пересадке дорсальной губы бластопора одного зародыша в вентральную область другого зародыша амфибий (Spemann, Mangold, 1924). Организатор здесь представляет собой группу клеток, способную индуцировать у реципиента развитие полной оси тела, включая нервную пластинку, а также стимулировать конвергенцию и вытягивание прилегающих групп клеток (Harland, Gerhard, 1997; Ariaz, Stevenson, 2018). Молекулярный анализ Шпеманновского организатора (дорсальной губы бластопора) у зародышей шпорцевой лягушки показал, что он выступает в качестве источника сигнальных факторов и его индуктивный потенциал отражает активность этих факторов. Этими сигнальными факторами являются ингибиторы BMP, Nodal и Wnt сигнальных каскадов (De Robertis et al., 2001). Структуры, обладающие индуктивным потенциалом, напоминающим организатор амфибий были обнаружены и у других позвоночных – гензеновский узелок у птиц, эмбриональный щиток у рыб, узелок у млекопитающих. Однако в ходе экспериментов, оказалось, что не все организаторы обладают полным спектром индукционных активностей, как в случае организатора у амфибой. Так, пересадка зародышевого узелка у мышей может индуцировать лишь развитие неполной оси, без конечного мозга (Beddington, 1994). Было выяснено, что для индукции полноценной оси требуется присутствие передней висцеральной эндодермы (ПВЭ) (Thomas, Beddington, 1996). Оказалось, что ПВЭ содержит группу клеток, дифференцирующихся еще до формирования первичной полоски и экспрессирующих гены, необходимые для индукции переднеголовных структур, такие как *Otx2*, *Lhx1*, *Foxa2*, *Cer1*, *Lefty1*, *Dkk1* (Andoniadou, Martinez-Barbera, 2013). Аналогом ПВЭ у птиц является гипобласт, у рыб – дорсальный синцитиальный слой, у амфибий – желточные клетки вегетативного полюса, что указывает на вероятную консервативность роли этих структур в зародышах. На сегодняшний день точка зрения о важной роли ПВЭ в дифференцировке передней части нервной пластинки является общепринятой (Wilson, Houart, 2004; Andoniadou, Martinez-Barbera, 2013). При этом, сигналы ПВЭ взаимодействуют с другими сигнальными центрами, такими как вышеописанные гаструляционные организаторы и осевая мезодерма, вентрально примыкающая к нервной пластинке. Совокупная активность этих сигнальных центров защищает переднюю часть нервной пластинки от воздействия постериоризующих факторов.

Показано, что для нейральной дифференцировки по переднему типу требуется подавление BMP, TGF-beta Wnt/beta-catenin сигнальных каскадов (Watanabe et al., 2005). Эта точка зрения нашла свое подтверждение в исследованиях особенностей экспрессии генов и экспериментах по модуляции их активности полученных на представителях рыб, птиц, млекопитающих и, в первую очередь, амфибий. Было показано, что клетки анимальной эктодермы амфибий, в отсутствие внешних сигналов дифференцируются в переднюю нейральную эктодерму (Grunz, Tacke, 1989), что и было названо “индукцией по-умолчанию”. Однако, при обработке таких клеток факторами BMP, происходила их дифференцировка по эпидермальному пути (Wilson, Hemmati-Brivanlou, 1995), что подтверждало важность подавления BMP антагонистами, экспрессирующимися в шпемановском организаторе (факторы Noggin и Chordin), для нейральной индукции. Открытие белка Cerberus, обладающего способностью с одной стороны ингибировать сигнальные пути BMP, TGF-beta Wnt/beta-catenin, а с другой – индуцировать полноценные осевые структуры (Piccolo et al., 1999) показало, что ингибирование этих трех сигнальных путей важно для нормальной переднеголовной дифференцировки.

Было показано, что молекулы Wnt оказывают постериоризующее влияние на нейральную ткань. Так, у амфибий наблюдается градиент уровня активности Wnt каскада с минимумом в головной части зародыша (Kiecker, Niehrs, 2001), что согласуется с данными на млекопитающих, где такие мишени Wnt/beta catenin каскада, как гены *Axin2* и *Sp5*, экспрессиируются в задней и отсутствуют в передней части нервной пластинки (Andoniadou et al., 2007). У рыб повышенный уровень активности Wnt каскада приводит к дифференцировке зачатка будущего конечного мозга и тканей глаза по пути промежуточного отдела мозга (Heisenberg et al., 2001).

В качестве антагонистов Wnt каскада были описаны два ранних переднеголовных гена – *Anf/Hesx1* и *Six3*, подавление экспрессии которых приводит к редукции структур конечного мозга (Zaraisky et al., 1992; Dattani et al., 1998; Lagutin et al., 2003).

Другими факторами, обладающими постериоризующей активностью являются ретиноевая кислота (Maden 1999) и факторы семейства FGF (Mason, 2007).

При этом важно отметить, что ряд исследований указывает на необходимость FGF и Wnt сигналов для самых ранних этапов нейральной индукции еще на стадии гаструлы, а последующее ингибирование BMP сигнала закрепляет уже состоявшуюся нейральную дифференцировку (Streit et al., 2000; Linker, Stern, 2004; Wilson et al., 2001; Wilson, Houart, 2004).

Различия индуктивных механизмов у представителей разных классов позвоночных встречаются и в отдельных аспектах нейральной дифференцировки. Так, согласно традиционной модели, нотохорд, в качестве первичного индуктора, посредством активности секретируемого транскрипционного фактора Shh, запускает формирование дна будущей нервной трубки а затем и ее дорсо-вентральную стратификацию. Однако было показано, что у птиц экспрессия *Shh* в зачатке дна нервной трубке обнаруживается раньше, чем в нотохорде, что требует уточнения и, возможно, пересмотра существующей индукционной модели (Kremnyov et al., 2018).

Подобные различия фундаментальных онтогенетических процессов у представителей разных классов позвоночных делают актуальными попытки исследований базовых регуляторных механизмов у представителей эволюционно древних групп, у которых с большой долей вероятности мозгли сохраниться паттерны, присущие предковым формам.

ПОДХОДЫ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИСТОРИИ КОНЕЧНОГО МОЗГА

Эволюционное происхождение структур конечного мозга позвоночных долгое время оставалось неясным (Pani et al., 2012).

Морфологические отличия позвоночных от беспозвоночных велики, и у последних не обнаружено структур, очевидно гомологичных головному мозгу позвоночных (Briscoe, Ragsdale, 2019). У многих беспозвоночных нет централизованной нервной системы, а проведенный широкоформатный сравнительный анализ показал, что централизация нервной системы у кольчатых червей и членистоногих с одной стороны и позвоночных с другой происходили независимо (Martin-Duran et al., 2018).

Исторически, основным методом реконструкции предковых форм традиционно являлась сравнительная морфология. Она дополнилась сравнением особенностей экспрессии регуляторных генов и механизмов развития (evo-devo), а также такими усовершенствованными морфологическими подходами, как анализ серий срезов на электронном микроскопе (serial transmission electron microscopy, TEM) с последующим восстановлением объемной структуры и конфокальная микроскопия меченых специфическими антителами образцов.

Еще один из появившихся в последнее время подходов – филостратиграфия, исследующая эволюционное происхождение генов, экспрессирующихся в той или иной структуре мозга позвоночных (Domazet-Loso, et al., 2007; Sestak et al., 2015). Полученные методами сравнительной геномики данные позволяют оценить на каком этапе эволюции был сформированы генетическая предпосылки для появления определенной структуры. В частности, когда такой подход был пременен к анализу генов, экспрессирующихся в отделах и структурах мозга позвоночных, было установлено, что пик появления новых генов для мозга в целом (включая передний средний и задний отделы) наблюдается у ланцетника. В то же время, если детализировать анализ генов конечного мозга, разделив их на дорсальный и вентральный отделы, то гены вентрального теленцефалона в основном появились у ланцетника, хотя дополнительные пики наблюдаются и позже – у бесчелюстных и костных рыб. Гены дорсального отдела конечного мозга активно появились уже у позвоночных. На основании такого анализа можно следать вывод, что большинство генов, вовлеченных в развитие мозга позвоночных появились у общего предка бесчерепных и позвоночных. Исключение составляют лишь гены дорсального отдела конечного мозга, многие из которых появились уже у позвоночных (Holland, 2015).

Передне-задняя и дорсо-вентральная морфологическая дифференцировка ЦНС у каждого из модельных объектов уже на ранних этапах развития характеризуется особенностями экспрессии специфических генов-маркеров, что привело к появлению концепции геноархитектуры (Puelles, Ferran, 2012). Эта разметка на молекулярном уровне отмечает границы нейромеров, часто совпадающие с сегментацией на анатомическом уровне. Высокая степень консерватизма сегментации головного мозга у разных групп позвоночных как на морфологическом и молекулярном уровне указывает на то, что план строения и его генетическая основа этой структуры сформировались у общего предка группы.

Одним из основных путей при реконструкции эволюционно базового плана строения отдельной структуры является исследование особенностей экспрессии ортологов ключевых генов маркеров этой структуры у разных групп позвоночных и их ближайших родственников. Наиболее близкими группами к позвоночным являются такие представители хордовых как бесчерепные (ланцетники) и оболочники. В последние годы появилось много новых данных об особенностях экспрессии регуляторных генов в раннем развитии этих групп, которые мы и рассмотрим ниже.

ПОИСК ГОМОЛОГОВ КОНЕЧНОГО МОЗГА У БЕСЧЕРЕПНЫХ И ОБОЛОЧНИКОВ

Тип хордовых включает в себя три подтипа – бесчерепных (*Cephalochordata*), оболочников (*Tunicata*) и позвоночных (*Vertebrata*).

Всех представителей типа хордовых объединяет наличие мезодермального тяжа – нотохорда, хвостового (постанального) отдела тела и дорсально расположенной нервной трубки. Эволюционная дивергенция трех групп хородовых произошла около 550 млн лет назад (Putnam et al., 2008).

Подтип бесчерепных или ланцетников включает 23 вида морских животных. Внешне ланцетники похожи на рыб, но не имеют конечностей, челюстей и парных сенсорных органов, характерных для позвоночных, по типу питания – фильтраторы.

Секвенирование генома флоридского ланцетника *Branchiostoma floridae* показало высокий уровень его синтении с геномами позвоночных. Проведенное сравнение также подтвердило идею, впервые высказанную в 1970 г. Ohno о двух раундах полногеномной дупликации, произошедшей у позвоночных. Часть дополнительных копий генов, появившихся при этой дупликации были впоследствии утрачены, но гены, участвующие в развитии и кодирующие сигнальные белки в массе своей сохранились, и, вполне вероятно, послужили генетическим фундаментом обеспечившим появление и последующее развитие сложноструктурированного мозга позвоночных.

Отсутствие геномной дупликации и медленная скорость эволюции позволяют рассматривать бесчерепных как группу, близкую по строению к предковым формам хордовых (Holland, 2015). Дополнительной поддержкой такого взгляда выступают ископаемые формы, такие как *Haikouella*, в значительной мере сходные с ланцетником, но обладавшие парными глазами и сравнительно большими размерами мозга (Morris, Caron, 2014).

На переднем крае нервной трубки ланцетника располагается утолщение – мозговой пузырь, который морфологически имеет не так много общих черт с отделами головного мозга позвоночных. Однако при анализе паттернов экспрессии консервативных регуляторных генов было показано, что определенные гомологичные черты с мозгом позвоночных имеются. Это задний отдел, промежуточный мозг с гомологом пинеального органа, и, возможно, маленький по размеру средний мозг, который получает сигналы от фронтального глаза (Toresson et al., 1998).

Анатомически ЦНС ланцетника не имеет выраженной сегментации, за исключением задней границы мозгового пузыря и передне-задняя маркировка обычно производится по сомитам, которые тянутся до самого переднего края тела. Доказательством наличия у ланцетника гомолога заднего отдела мозга является обнаруженная экспрессия Hox генов (Shubert et al., 2006). Анализ паттернов экспрессии регуляторных генов показал, что у ланцетника присутствуют, по крайней мере частично, генетические механизмы, детерминирующие три основных организационных центра (вторичных организатора) мозга позвоночных – передний нервный валик (anterior neural ridge, ANR), *zona limitans intrathalamica* (ZLI) и граница между задним и средним мозгом (MHB). Передний край ЦНС у ланцетника, как и у позвоночных, экспрессирует *Dlx5*, *FoxG1*, *Fgf8* (Holland et al., 1996; Bertrand et al., 2011).

На основе проведенного исследования особенностей экспрессии 48 маркерных генов ланцетника, гомологичных описанным регуляторам развития головных структур позвоночных была предложена схема разделения зачатка его нервной системы на 2 региона – передний *Otx*-положительный (ARCH, archencephalic prototagma) и задний, экспресирующий *Gbx* (DUE, deuteroencephalic prototagma). У позвоночных граница между областями экспрессии этих генов отмечает один из важных вторичных организаторов – границу среднего и заднего отделов мозга (MHB). Передний (*Otx*+) домен при этом может быть в свою очередь подразделен на основе экспрессии генов *Fezf* и *Irx*. Как и у позвоночных, у ланцетника экспрессия *Fezf* обнаруживается в самой передней части нервной трубки на ранних стадиях ее формирования. Сзади к этому домену, примерно посередине мозгового пузыря прилегает область экспрессии *Irx*. Исследования, проведенные на позвоночных, показали, что граница областей экспрессии *Fezf* и *Irx* дает начало важному организационному центру на границе преталамуса и таламуса – ZLI (Scholpp et al., 2007; Rodriguez-Seguel et al., 2009). При этом гомология этой области у ланцетника и позвоночных не является полной, поскольку экспрессирующийся в этой области у ланцетника ген engrailed у позвоночных обнаруживается на границе среднего и заднего отделов (Castro et al., 2006).

По результатам анализа геноархитектуры передней части мозгового пузыря ланцетника на стадии нейрулы (7 сомитов) Albuixech-Crespo и соавторы называют *Fezf* положительную область гипоталамо-преталамическим зачатком (HyPTh), а прилегающий к ней сзади *Irx*-положительный домен – диэнцефало-мезенцефалическим зачатком (DiMes). В свою очередь, передний из доменов (HyPTh) дополнительно подразделяется на три зоны по передне-задней оси. Авторы приходят к выводу, что наиболее передний из отделов мозгового пузыря ланцетника соответствует зачатку переднего отдела промежуточного мозга позвоночных (Albuixech-Crespo et al., 2017). Этот вывод согласуется с доминирующей на сегодняшний день точкой зрения, согласно которой, у современных бесчерепных (и, с большой долей вероятности у предковых форм хордовых) в качестве переднего отдела ЦНС выступает гомолог промежуточного отдела мозга позвоночных, а конечный отдел мозга появляется в эволюции позже, только у позвоночных. Также отмечается, что промежуточный и средний отделы мозгового пузыря ланцетника, гомологичные соответствующим отделам мозга позвоночных развиты слабо, состоят лишь из двух рядов клеток, экспрессирующих *Pax4/6*. Это может свидетельствовать об эволюционном единстве гомологичных этому сегменту отделов мозга позвоночных – таламуса, претектума и среднего мозга (Albuixech-Crespo et al., 2017).

Поскольку дифференцировка нервной системы у ланцетника, как и у позвоночных, происходит на ранних этапах онтогенеза, в качестве объектов исследований при изучении особенностей строения отдельных структур и поисках гомологий с другими группами животных выступают обычно ранние стадии развития. В то же время, проведенный анализ экспрессии переднеголовных генов-маркеров у взрослых особей ланцетника принес неожиданные результаты. После метаморфоза в мозговом пузыре взрослого ланцетника был обнаружен домен, близкий по своей геноархитектуре нейроэпителию развивающихся коры и подкорковой области позвоночных (Benito Gutierrez et al., 2018). В нем обнаруживалась обширная область экспрессии гена *FoxG1*, простирающаяся от глаза, до переднего края инфундибулярного органа. На личиночной стадии экспрессия *FoxG1* обнаруживалась только в отдельных клетках передней части тела. Кроме *FoxG1* в дорсальной части мозгового пузыря была обнаружена экспрессия генов *EmxA* и *EmxB*, не описанные ранее на личиночной стадии и гены *Lhx2* и *Lhx9*. Дорсо-вентральная компартментализация конечного мозга позвоночных, состоящего из коры и подкорковый зоны, может быть охарактеризована областями экспрессии генов *Pax6* и *Nkx2.1* (Hebert, Fishell, 2009). Оказалось, что паттерн экспрессии гена *Pax4/6* у взрослого ланцетника сильно отличается от личиночной стадии, больше напоминая паттерн ортолога *Pax6* позвоночных. Так, у взрослых особей ген *Pax4/6* обнаруживается только в дорсальной части мозгового пузыря, частично перекрываясь с доменами экспресии *Emx* и *Lhx2/9*. Паттерн экспрессии *Nkx2.1*, наблюдаемый на личиночной стадии в задне-вентральной части мозгового пузыря, на взрослой стадии дополняется доменом, достигающим передней части мозгового пузыря, частично перекрывающегося с областью экспрессии *FoxG1*. Домен экспрессии в мозговом пузыре был обнаружен на взрослой стадии и у гена *Hedgehog* (*Shh*, *Hh*), активность которого в передней части нервной пластинки у позвночных необходима для формирования конечного мозга (Retaux, Kano, 2010). Поздняя активация экспрессии *Hh* в мозговом пузыре индуцирует дифференцировку обширной области, экспрессирующей *FoxG1*, которая в дальнейшем подразделяется на дорсальный *Emx-Lhx2/9-Pax4/6* положительный и вентральный *Hh-Nkx2.1*-положительный домены.

В совокупности с данными об обнаружении у ланцетника дорсальной популяции глутаматэргических и холинэргических нейронов это исследование показывает, что у ланцетника, по всей вероятности, дифференцировка структур мозга происходит в два этапа: на личиночной стадии формируются вентральные структуры, а после метаморфоза – дорсальные (Benito Gutierrez et al., 2018). На наш взгляд, эти новые данные интересны также с точки зрения общего понимания механизмов появления новых структур. Наблюдаемая у ланцетника выраженная гетерохрония экспрессии генов-маркеров конечного мозга ярко иллюстрирует предпочтительную вероятность появления эволюционно новой структуры на сравнительно поздних стадиях онтогенеза.

У оболочников, в отличие от ланцетников, на позвоночных внешне похожа лишь свободно плавающая личинка, которая после метаморфоза превращается во взрослую особь, ведущую прикрепленный образ жизни. Наиболее изученным представителем этой группы является асцидия *Ciona intestinalis*, взрослая особь коорой имеет мешковидное тело и два отверстия – вводящий и выводящий сифоны (Nieuwenhuys, 2002). При этом, анализ геномных данных показал, что, несмотря на большие морфологические различия, оболочники являются более близкими родственниками позвоночных, чем бесчерепные (Delsuc et al., 2006). В то же время, отмечается, что оболочники эволюционировали сравнительно быстро и их геном сильно редуцировался, утратив многие регуляторные гены. Личинка же состоит из сравнительно небольшого числа клеток. Эти обстоятельства сильно осложняют попытки воссоздания общего предка позвоночных и оболочников (Holland, 2015).

Характерные признаки хордовых – нотохорд и дорсально расположенная центральная цервная система обнаруживаются у асцидии только на личиночной стадии и при метаморфозе эти структуры ресорбируются. ЦНС личинки включает расширенную тонкостенную переднюю часть, веретенообразный промежуточный и длинный хвостовой отделы. Передний отдел обычно называют сенсорным пузырем и включающую вентральный отолит, группу вентро-каудальных клеток, предположительно выполняющих роль сенсора давления и движения и относительно крупный фоторецепторный орган.

В сенсорном пузыре личинки асцидии была обнаружена экспрессия гена *Hroth* – единственного гомолога гена *Otx* позвоночных. Характер экспрессии обнаруженного гена *HrPax2/5/8* отличался от гомологичных ему генов *Pax2*, *Pax5* и

Pax8 позвоночных. Были также обнаружены три *Hox* гена, гомологичные генам *Hoxb1*, *Hox3*, *Hox5* (Wada et al., 1998).

Полученные данные показывают, что сегментация нервной системы на основные отделы – передний (прозенцефалон + средний мозг), средний (продолговатый мозг) и задний (спинной мозг) отделы наблюдаются у всех хордовых что, по всей видимости, является отражением появления такой дифференцировки еще до эволюционного разделения бесчерепных, оболочников и позвоночных.

КОНЕЧНЫЙ МОЗГ У БЕСЧЕЛЮСТНЫХ, КАК ДРЕВНЕЙШИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ

В контексте изучения механизмов раннего развития нервной системы позвоночных, бесчелюстные (круглоротые) являются уникальной группой животных. Поскольку их предки отделились от общего ствола позвоночных на самых ранних этапах их эволюции, у генов этой группы, с большой вероятностью, мог сохраниться древний тип экспрессионных паттернов, характерный для предков позвоночных.

Согласно литературным данным, разделение ветвей бесчелюстных и челюстноротых произошло на самых ранних этапах эволюции позвоночных в палеозое. По ряду оценок, это разделение могло произойти еще в кембрийском периоде, то есть около 535–462 млн лет назад (Janvier, 2006; Kuraki, Kuratani, 2006; Feinberg, Mallatt, 2013). Наиболее древним из обнаруженных на сегодняшний день видов миног является *Priscomyzon riniensis*, описанный в 2006 г. (Gess et al., 2006). Авторы отмечают, что у этого девонского представителя миног уже присутствовали характерные морфологические признаки группы, такие как, круглая воронка с зубами и жаберный аппарат. Возраст этого ископаемого из Южной Африки составляет около 360 млн лет.

Современные бесчелюстные включают в себя представителей двух классов – миног и миксин. Большинство исследователей на сегодняшний день сходятся во мнении, что круглоротые являются монофилетической группой и разделение миног и миксин ориентировочно датируется 470–390 млн лет (Kuraki, Kuratani, 2006; Osorio, Retaux, 2007).

По сравнению с миксинами, миноги более доступны в качестве лабораторного объекта, поэтому исторически основная часть работ была посвящена исследованию именно этой группы. Интерес к миногам, как к не вполне традиционному, но перспективному объекту для лабораторных исследований, неуклонно возрастает (Green et al., 2014; McCauley et al., 2015; Yang et al., 2016).

На сегодяшний день описано около 40 видов миног, живущих в умеренных широтах обоих полушарий (Renaud, 2011). Представители всех видов миног размножаются лишь один раз в жизни. Инкубация икры в естественных условиях происходит на галечниковых грунтах при температуре воды 11–18°C. Продолжительность инкубации и скорость эмбрионального развития зависят от температуры воды. Через несколько дней после вылупления личинки миног – пескоройки покидают гнезда и расселяются по речной системе (Павлов и др., 2014), где проводят по разным данным от трех до пяти лет.

С точки зрения строения тела миноги имеют ряд общих с челюстноротыми признаков, такие как головной и спинной мозг, хорду, череп, глоточные арки, производные сомитов. В то же время у них есть ряд существенных отличий – рот-присоска, формирующийся в ходе метаморфоза, отрытый пинеальный орган, два полукружных канала во внутреннем ухе, иное строение глотки, отсутствуют челюсти и парные конечности (Kuratani et al., 2001; Osorio, Retaux, 2007).

Генетической основой ряда ароморфозов и возникновения новых структур позвоночных могли стать дупликации геномов. Вопрос о том, в какой момент в эволюции они происходили активно обсуждался в последнее время и важную роль тут играл анализ кластеров *Hox*-генов у разных групп животных. Большинство челюстноротых содержат четыре локуса *Hox* и *ParaHox* генов, тогда как ланцетник, наиболее примитивный представитель хордовых, содержит всего по одному локусу этих генов. Происхождение четырех локусов у челюстноротых объяснялось двумя раундами полногеномой дупликации на ранних этапах эволюции (Putnam et al., 2008). Как было показано, в геноме миног, в отличие от челюстноротых, содержится, по меньшей мере, шесть локусов гена *Hox* (Mehta et al., 2013), что может указывать на дополнительный раунд дупликации этих генов у миног. Однако, при этом, у миног было обнаружено только два локуса *ParaHox* генов (*Gsx*, *Pdx*, и *Cdx*). Эти данные, в свою очередь, говорят о том, что дупликация *Hox* генов у миног, вероятно, являлась результатом не полногеномной дупликации, а скорее частичной, произошла уже после разделения эволюционных линий миног и челюстноротых (Zhang et al., 2017). Таким образом, согласно этой точке зрения, общим у бесчелюстных и челюстноротых был один раунд полногеномной дупликации, а в дальнейшем дупликации происходили в этих группах независимо.

Поскольку появление конечного мозга стало одним из важнейших ароморфозов позвоночных, большое внимание исследователей привлекает строение головного мозга миног, и особенно конечного мозга, который морфологически впервые появляется именно у этой группы животных (рис. 1в).

Морфологически головной мозг миног похож на мозг костистых рыб, за исключением ряда особенностей, таких как хорошо развитый эпифиз, расположенный под назальным отверстием, и очень слабо развитый мозжечок (Sugahara et al., 2017). При исследовании геноархитектуры конечного мозга миног, в его дорсальной части была обнаружена экспрессия генов *Pax6* (Murakami et al., 2001) и *Emx* (Tank et al., 2009), а в вентральной – генов *Dlx* (Miojin et al., 2001; Murakami et al., 2001; Neidert et al., 2002). Обнаружение зон экспрессии *Pax6* и *Dlx* и стало на ранних этапах исследований основным свидетельством наличия у миног структур, гомологичных конечному мозгу челюстноротых. При этом отмечалось, что кора и гипоталамус у миног развиты еще слабо (Murakami et al., 2005). Долгое время у миног считались отсутствующими структуры медиального ганглионарного бугорка (компонента базальных ядер конечного мозга) и ромбической губы – зачатка будущего мозжечка, что склоняло исследователей ко мнению о возникновении этих структур у челюстноротых уже после их отделения в эволюции от бесчелюстных (Sugahara et al., 2017).

Поиск консервативных для позвоночных переднеголовных генов у миног, в сочетании с исследованиями на миксинах, привели к тому, что в последние годы у миног был обнаружен ряд новых для них генов, что внесло коррективы в сложившуюся ранее картину геноархитектуры передних отделов мозга. Были найдены два ортолога гена *Nkx2.1* – гены *Nkx2.1/2.4B* и *Nkx2.1/2.4C*, экспрессия которых наблюдается в вентральной зоне подкорковой области конечного мозга. Поскольку у позвоночных ген *Nkx2.1* описан в качестве маркера медиального ганглионарного бугорка (Sussell et al., 1999), эта находка указывает на наличие у миног структур, гомологичных медиальному ганглионарному бугорку челюстноротых, из которого, как уже отмечалось, развивается двигательный центр паллидум, ранее считавшийся отсутствующим у бесчелюстных (Sugahara et al., 2016). Также у миног были обнаружены три ортолога гена *Pax6*. Все они экспрессируются в формирующихся глазных структурах и мозге, что соответствует экспрессии гена *Pax6* у челюстноротых, у которых этот ген является ключевым регулятором развития глаз и ЦНС (Osumi et al., 2008; Klimova, Kozmik, 2014). При этом паттерн экспрессии генов *Pax6* миног в других структурах различается. Экспрессия *Pax6a* обнаруживается в печени, указывая на то, что у предков позвоночных ген *Pax6*, по всей видимости, участвовал в формировании этого органа (Ravi et al., 2019).

В области заднего мозга у миног были обнаружены гомологи генов, участвующих в развитии ромбической губы и мозжечка челюстноротых – гены *Atoh1*, *Wnt1* и *Ptf1a* (Wullimann et al., 2011). Это указывает на то, что генетические основы формирования этой структуры мозга, морфологически отсутствующей у бесчелюстных, могли сформироваться еще до эволюционного разделения бесчелюстных и челюстноротых. В нотохорде наблюдается экспрессия гена *Shh* (рис. 2).

Экспрессия раннего регулятора развития мозга – гена *Otx* у миног, начинается на самых ранних этапах онтогенеза, в районе спинной губы бластопора, а у личинки наблюдается в области переднего и среднего отделов мозга, до границы между средним и задним мозгом (Tomsa, Langeland, 1999; Suda et al., 2009).

Ингибитором экспрессии гена *Otx* у позвоночных и одним из ключевых регулятоорв ранней дифференцировки переднего мозга позвоночных являются гомеобоксные гены класса *Anf/Hesx1* (далее *Anf*) (Zaraisky et al., 1992). В серии работ на амфибиях было показано, что в клетках зачатка переднего мозга белок Anf играет роль специфического репрессора транскрипции, подавляя экспрессию генов, индуцирующих дифференцировку задних отделов мозга (Ermakova et al., 1999, 2007; Eroshkin et al., 2002; Martynova et al., 2004; Bayramov et al., 2004). Исходя из этого, была выдвинута гипотеза о том, что репрессорная активность *Anf* в передней части зачатка центральной нервной системы у предков позвоночных обеспечила образование в этом регионе особой зоны, клетки которой оказались свободны от инструктирующего влияния генов, определяющих судьбу более задних регионов нервной системы. В результате, эта передняя зона нейрального зачатка, экспрессирующая *Anf*, получила свободу эволюционировать в новом направлении, что и привело, в конце концов, к образованию переднего мозга. Эта гипотеза получила важное подтверждение после того, как у трех видов миног *Lethenteron camtschaticum, Lampetra fluviatilis* и *Petromyzon marinus* был обнаружен ген *Anf* (Bayramov et al., 2016, Байрамов и др., 2017, рис. 2).

Функциональные исследования показали, что ген *Anf* миног по своим свойствам сходен с генами *Anf* челюстноротых, обладает ингибиторной активностью, подавляя экспрессию гена *Otx* и усиливая экспрессию ключевого регулятора развития конечного мозга – гена *FoxG1*. Это указывает на то, что появление генов класса *Anf* было существенным, если не ключевым, фактором в возникновении у позвоночных структур конечного мозга (Bayramov et al., 2016).

Белок, кодируемый неоднократно упоминавшийся выше геном *FoxG1*, относится к семейству Forkhead-связывающих транскрипционных фак-

Рис. 2. Области экспрессии регуляторных генов на ранних стадиях развития европейской речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) показанные методом гибридизации *in situ*. а, б – паттерн экспрессии гена *Hedhehog* (*Hh*). ZLI – *zona limitans interthalamica*. в–з – экспрессия генов зачатка конечного мозга. в, г – экспрессия гена *Lanf*. д, е – экспрессия гена *NogginB*. ж, з – экспрессия гена *FoxG1*. км – конечный мозг, уп – ушной пузырек.

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

Пространственный паттерн экспрессии *FoxG1* у миног в целом соответствует паттернам экспрессии *FoxG1* у других позвоночных, в том числе у шпорцевой лягушки (Ermakova et al., 2019). В тоже время имеется и ряд отличий. Так, экспрессия *FoxG1* у миноги впервые в развитии детектируется в формирующихся ушных плакодах и вентаральной части теленцефалона (рис. 2). При этом у миноги *FoxG1* совсем не экспрессируется в дорсальной части теленцефалона, тогда как у других позвоночных экспрессия этого гена в теленцефалоне носит градиентный характер, с возрастаниеми интенсивности от дорсальной части к вентральной (Danesin, Houart, 2012). Также у миноги в отличие от других позвоночных экспрессия *FoxG1* не обнаруживается в формирующихся глазных структурах, что может объясняться особенностью развития этих структур у миног. В отличие от челюстноротых у миног наблюдается двухступенчатое развитие глаза и зрительного нерва. На эмбриональной стадии глаз покрыт толстой непрозрачной кожей, хрусталик незрелый что, возможно, указывает на примитивное состояние зрительной системы позвоночных (Melendez-Ferro et al., 2002; Suzuki et al., 2015). В этот период образуется небольшое количество волокон зрительного нерва. Позже в онтогенезе формируются новые оптические волокна, и после метаморфоза у взрослых миног развиваются полноценные глазные камеры.

При анализе особенностей динамики экспрессии генов *Anf* и *FoxG1* у миног было показано, что у этих генов миног наблюдается гетерохрония экспрессии по сравнению с их гомологами у более эволюционно продвинутых позвоночных — амфибий (Ермакова и др., 2020). У шпорцевой лягушки возрастание экспрессии *Anf* наблюдается еще до начала нейруляции, на стадии поздней гаструлы, в то время как у миноги этот ген начинает активно экспрессироваться только начиная со стадии поздней нейрулы (ст. 20 по Tahara, 1988). Ген *FoxG1* у шпорцевой лягушки начинает экспрессироваться уже в конце гаструляции — начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга, в то время как у миног экспрессия *FoxG1* обнаруживается в области конечного мозга на стадии головного выроста, т.е. уже после окончания нейруляции (стадия 22 по Tahara, 1988).

Такая гетерохрония экспрессии генов конечного мозга соответствует гипотезе о том, что этот отдел мозга, являясь наиболее эволюционно молодым отделом центральной нервной системы, мог появиться у предков позвоночных в качестве надстройки на поздних стадиях их эмбрионального развития (Ермакова и др., 2020).

Еще одним регулятором раннего развития структур переднего мозга позвоночных являются гены семейства *Noggin*. Открытие гена *Noggin* можно по праву отнести к одним из важнейших событий в истории молекулярной биологии развития. Noggin стал первым известным фактором, в норме секретирующимся в области Шпемановского организатора, для которого была показана способность вызывать формирование дополнительных осей тела в случаях его экспериментальной эктопической экспрессии на вентральной стороне зародыша амфибий (Dale, Slack, 1987; Smith, Harland, 1992; Lamb et al, 1993; Smith et al., 1993; Slack, Tannahill, 1993). Впоследствии была также показана ключевая роль гена Noggin в широком спектре онтогенетических процессов, в частности, в дифференцировке и установлении паттерна зачатка нервной системы и мезодермы сомитов (Knecht, Harland, 1997; McMahon et al., 1998), в развитии суставов и черепных швов (Brunet et al., 1998; Warren et al., 2003), дифференцировке волосяных луковиц (Botchkarev et al., 1999). Также показано, что Noggin может подавлять развитие кровеносных сосудов (Reese et al., 2004).

В последствии были описаны два гомолога гена *Noggin* — *Noggin2* и *Noggin4* (Fletcher et al., 2004; Eroshkin et al., 2006). На модели шпорцевой лягушки было показано, что паттерн экспрессии гена *Noggin2* в целом напоминает описанный ранее паттерн экспрессии гена *Noggin1*. В частности, начало экспрессии гена *Noggin2* наблюдается на стадии нейрулы в области переднего нервного валика, а именно — во внутреннем (сенсорном) слое нервной пластинки, а на более поздних стадиях экспрессия обнаруживается в дорсальной области формирующегося переднего мозга, и, на более низком уровне — в районе заднего мозга, спинных участках сомитов и в формирующемся сердце (Eroshkin et al., 2006).

Долгое время считалось, что основной (по сути — единственной описанной) функцией *Noggin1* в развитии позвоночных является подавление сигнального каскада BMP (bone morphogenetic proteins) — группы ростовых факторов из суперсемейства TGF-beta. Модуляция активности BMP каскада является необходимым условием для формирования нервной ткани и дифференцировки дорсальной мезодермы (Xanthos et al., 2002; Moreau, Leclerc, 2004). Таким образом, выступая в качестве антагониста BMP сигнала и обладая способностью связывать молекулы BMP, *Noggin* играет принципиальную роль в двух важнейших онтогенетических процессах: дорсализации и нейрализации. Дорсализация представляет собой процесс развития зародышевой мезодермы в скелетную мускулатуру, а нейрализация — дифференцировку эмбриональной эктодермы по нейральному пути. Активной секретируемой формой фактора Noggin является гомодимер типа цистинового узла, в котором две молекулы связаны между собой дисульфидным мостиком (Smith et al., 1993).

При исследовании гена *Noggin2* было показано, что он обладает способностью подавлять не только BMP, но также и Nodal/Activin и Wnt/beta-cathenin сигнальные каскады, играющих ключевые роли в клеточной дифференцировке и развитии головных структур позвоночных. Оверэкспрессия мРНК *Noggin2* в зародышах *X. laevis* приводит к формированию дополнительного комплекса осевых структур в которых наблюдается экспрессия переднеголовных генов (Bayramov et al., 2011).

Ортолог гена *Noggin2*, ген *NogginB*, экспрессирующийся в области зачатка конечного мозга на ранних стадиях его дифференцировки был обнаружен у миног (рис. 2).

В целом, при сопоставлении геноархитектуры мозга миног и челюстноротых обнаруживается много гомологий, свидетельствующих о том, что сегментация отделов мозга появилась у предковых позвоночных до разделения эволюционного пути этих групп животных.

Живых зародышей другой группы бесчелюстных – миксин, ввиду экологических особенностей этих животных, ведущих глубоководный образ жизни, не удавалось получить очень долгое время. Систематическое изучение развития миксин в лаборатории было начато лишь в последние 10–15 лет группой японских исследователей под руководством проф. Куратани (Ota et al., 2007; Oisi et al., 2013; Sugahara et al., 2016).

Анализ нейромеров головного мозга на ранних стадиях развития миксины *Eptatretus burgeri* показал наличие в области конечного мозга экспрессии ортологов генов *FoxG1*, *EmxB* и *Pax6*. Гипоталамус, обнаруживается спереди от промежуточного мозга как области экспрессии гена *Hh2* (всего у миксины найдено три ортогола гена *Hh*) и гена *Nkx2.1/2.4*, ортологичного генам *Nkx2.1* и *Nkx2.4* позвоночных. Как и у миног, область экспрессии *Hh* отмечает ZLI между преталамусом и таламусом в промежуточной отделе мозга (Sugahara et al., 2016).

Таким образом, по количеству обнаруженных гомологий, в геноархитектуре мозга бесчелюстных и челюстноротых, можно заключить, что конечный мозг, впервые появился на самых ранних этапах эволюции позвоночных и основные молекулярные механизмы, лежащие в основе его закладки и формирования присутствовали у предков позвоночных.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ВЕКТОРЫ РАЗВИТИЯ КОНЕЧНОГО МОЗГА У ЧЕЛЮСТНОРОТЫХ

Эволюционный расцвет конечного мозга, безусловно, приходится на челюстноротых. В ходе эволюционного пути этой группы, одним из основных векторов развития конечного мозга являлось увеличение размеров и структурированности этого отдела, обеспечивающие развитие и усложнение поведенческого репертуара животных и высших форм нервной деятельности человека. В качестве одного из возможных механизмов такой экспансии рассматривается изменение времени закладки организационных центров, модулирующих тканевую дифференцировку. По передне-задней оси тела, как уже отмечалось такими центрами являются передний край нервной пластинки, путем секреции Fgf стимулирующий экспрессию генов *FoxG1* и *Emx1*, участвующих в развитии зачатка передних отделов мозга, и граница между средним и задним отделами мозга (MHB), секретирующая постериоризующий сигнал Wnt (Bielen et al., 2017). При этом, если у рыб активация этих сигнальных центров происходит одновременно, на стадии средней гаструлы, то у млекопитающих включение заднего центра происходит на более поздних стадиях. За счет этого временного сдвига активности заднего организатора, зачаток нервной пластинки дольше находится под воздействием сигналов, стимулирующих дифференцировку по переднему типу.

В заключение можно отметить, что, как показывает приведенный анализ литературных данных, в последние годы получено много новой информации об особенностях строения и геноархитектуры зачатка конечного мозга у низших позвоночных и их ближайших родственников – бесчерепных и оболочников. Возрастающая скорость появления этой информации и ее внушительные объемы вселяют надежду на качественный прогресс в понимании предпосылок и генетических механизмов, обеспечивших появление и последующее эволюционное развитие конечного мозга у позвоночных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено и публикация подготовлена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50215.

Эксперименты по исследованию генов *FoxG1* и *Noggin* миног проведены за счет гранта РФФИ № 18-04-00015. Анализ экспрессии гена *Hh* выполнен за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00098). Эксперименты по функциональному исследованию переднеголовных генов шпорцевой лягушки выполнены за счет гранта РФФИ № 18-29-07014. Исследование гена *Anf* выполнено за счет гранта по программе РАН “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий”.

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

Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Ерошкин Ф. М. и др. Гомеобоксный ген семейства Anf, обнаруженный у тихоокеанской миноги *Lethenteron camtschaticum*, подтверждает гипотезу о важности появления генов *Anf* для возникновения конечного мозга в эволюции позвоночных // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 241–251.

Ермакова Г.В., Кучерявый А.В., Зарайский А.Г. и др. Гетерохрония экспрессии генов Lanf и FoxG1 у миноги подтверждает появление конечного мозга как эволюционно молодой надстройки в центральной нервной системе позвоночных // Онтогенез. 2020 (принято в печать).

Павлов Д.С., Назаров Д.Ю., Звездин А.О., Кучерявый А.В. и др. Покатная миграция раних личинок европейской речной миноги *Lampetra fluviatilis* // Докл. акад. наук. 2014. № 459(2). С. 248–251.

Andoniadou C.L., Signore M., Sajedi E. et al. Lack of the murine homeobox gene *Hesx1* leads to a posterior transformation of the anterior forebrain // Development. 2007. V. 134(8). P. 1499–1508.

Bachy I., Berthon J., Retaux S., Defining pallial and subpallial divisions in the developing Xenopus forebrain // Mechanisms of Development. 2002. V. 117. P. 163–172.

Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M. et al. The presence of the *Anf/Hesx1* homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 39849.

Bayramov A.V., Martynova N.Yu., Eroshkin F.M. et al. The homeodomain-containing transcription factor X-nkx-5.1 inhibits expression of the homeobox gene Xanf-1 during the *Xenopus laevis* forebrain development // Mechanism of Development. 2004. V. 121. P. 1425–1441.

Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y. et al. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling // Development. 2011. V. 138. P. 5345–5356.

Benito Gutierrez E., Stemmer M., Rohr S.D. et al. Patterning of a elencephalon-like region in the adult brain of amphioxus // bioRxiv. 2018. V. 307629.

Bertrand S., Camasses A., Somorjai I. et al. Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 9160–9165.

Bielen H., Pal S., Tole S. et al. Temporal variations in early developmental decisions: an engine of forebrain evolution // Curr. Opin. Neurobiol. 2017. V. 42. P. 152–159.

Botchkarev V.A., Botchkareva N.V., Roth W. et al. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction // Nat. Cell. Biol. 1999. V. 1. P. 158–164.

Brunet L.J., McMahon J.A., McMahon et al. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton // Science. 1998. V. 280. P. 1455–1457.

Castro L.F.C., Rasmussen S.L.K., Holland P.W.H. et al. A Gbx homeobox gene in amphioxus: insights into ancestry of the ANTP class and evolution of the midbrain/hindbrain boundary // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 40–51.

Dale L., Slack J.M.W. Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis* // Development. 1987. V. 100. P. 279–295.

Danesin C., Houart C. A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases // Curr. Opin. Genet. Dev. 2012. V. 22. № 4. P. 323–330.

Danesin C., Houart C. A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases // Curr. Opin. Genet. Dev. 2012. V. 22. P. 1–8.

Danesin C., Peres J.N., Johansson M. et al. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1 // Dev. Cell. 2009. V. 16. № 4. P. 576–587.

Dattani M.T., Martinez-Barbera J.P., Thomas P.Q. et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse // Nat. Genet. 1998. V. 19(2). P. 125–133. https://doi.org/10.1038/477

Delsuc F., Brinkmann H., Chourrout D. et al. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates // Nature. 2006. V. 439. P. 965–968.

Domazet-Loso T., Brajkovic J., Tautz D. A phylostratigraphy approach to uncover the genomic history of major adaptations in metazoan lineages // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 533–539.

Ermakova G.V., Alexandrova E.M., Kazanskaya O.V. et al. The homeobox gene, *Xanf-1*, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neurectoderm of the *Xenopus laevis* embryo // Development. 1999. V. 126. P. 4513–4523.

Ermakova G.V., Solovieva E.A., Martynova N.Y. et al. The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions // Developmental Biology. 2007. V. 307. P. 483–497.

Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zaraisky A.G., Bayramov A.V. The expression of FoxG1 in the early development of the European river lamprey Lampetra fluviatilis demonstrates significant heterochrony with that in other vertebrates // Gene Expr Patterns. 2019. V. 34. P. 119073. https://doi.org/10.1016/j.gep.2019.119073

Eroshkin F.M., Ermakova G.V., Bayramov A.V. et al. Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis* // Gene Expr Patterns. 2006. V. 6. P. 180–186.

Eroshkin F., Kazanskaya O., Martynova N. et al. Characterization of cis-regulatory elements of the homeobox gene Xanf-1 // Gene. 2002. V. 285. P. 279–286.

Feinberg T.E., Mallatt J. The evolutionary and genetic origins of consciousness in the Cambrian Period over 500 million years ago // Front. Psychol. 2013. V. 4. P. 667. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00667

Fletcher R.B., Watson A.L., Harland R.M. Expression of Xenopus tropicalis noggin1 and noggin2 in early development: two noggin genes in a tetrapod // Gene Expr Patterns. 2004. V. 5. P. 225–230.

Gess R.W., Coates M.I., Rubidge B.S. A lamprey from the Devonian period of South Africa // Nature. 2006. V. 443(7114). P. 981–984.

Green S.A., Bronner M.E. The Lamprey: A jawless vertebrate model system for examining origin of the neural crest and other vertebrate traits // Differentiation. 2014. V. 87. P. 44–51.

Grunz H., Tacke L. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer // Cell Differ. Dev. 1989. V. 28(3). P. 211–217.

Hebert J.M., Fishell G. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required // Nat. Rev. Neurosci. 2008. V. 9. P. 678–685.

Heisenberg C.P., Houart C., Take-Uchi M. et al. A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalons // Genes Dev. 2001. V. 15(11). P. 1427–1434.

Holland N.D., Panganiban G., Henyey E.L. et al. Sequence and developmental expression of AmphiDll, an amphioxus Distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest // Development. 1996. V. 122. P. 2911–2920.

Holland P.W.H., Garcia-Fernandez J., Williams N.A. et al. Gene duplications and the origins of vertebrate development // Development. 1994 (suppl.). P. 125–133.

Janvier P. Modern look for ancient lamprey // Nature. 2006. V. 433. P. 921–924.

Kiecker C., Lumsden A. The role of organizers in patterning the nervous system // Annu. Rev. Neurosci. 2012. V. 35. P. 347–367.

Kiecker C., Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus* // Development. 2001. V. 128(21). P. 4189–4201.

Klimova L., Kozmik Z. Stage-dependent requirement of neuroretinal *Pax6* for lens and retina development // Development. 2014. V. 141. P. 1292–1302.

Kortüm F., Das S., Flindt M. et al. The core FOXG1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis // J. Med. Genet. 2011. V. 8. № 6. P. 396–406.

Kremnyov S., Henningfeld K., Viebahn C. et al. Divergent axial morphogenesis and early *shh* expression in vertebrate prospective floor plate // EvoDevo. 2018. V. 9. P. 4.

Kumamoto T., Hanashima C. Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development // Dev. Growth Differ. 2017. V. 59. № 4. P. 258–269.

Kuraku S., Kuratani S. Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences // Zoolog Sci. 2006. V. 23(12). P. 1053–1064.

Kuratani S., Nobusada Y., Horigome N. et al. Embryology of the lamprey and evolution of the vertebrate jaws: insights from molecular and developmental perspectives // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2001. V. 356(1414). P. 1615–1632.

Lagutin O.V., Zhu C.C., Kobayashi D. et al. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development // Genes Dev. 2003. V. 17(3). P. 368–379.

Lamb T.M., Knecht A.K., Smith W.C. et al. Neural induction by secreted polypeptide noggin // Science. 1993. V. 262. P. 713–718.

Linker C., Stern C.D. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists // Development. 2004. V. 131(22). P. 5671–5681.

Maden M. Heads or tails? Retinoic acid will decide // Bioessays. 1999. V. 21(10). P. 809–812.

Martin-Duran J.M., Pang K., Borve A. et al. Convergent evolution of bilaterian nerve cords // Nature. 2018. V. 553. P. 45–50.

Martynoga B., Morrison H., Price D.J. et al. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis // Dev. Biol. 2005. V. 283(1). P. 113–127.

Martynova N.Yu., Eroshkin F.M., Ermakova G.V. et al. Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent-2 determine the posterior limit of the *Xanf-1* expression in the neural plate // Development. 2004. V. 131. P. 2329–2338.

Mason I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development // Nat. Rev. Neurosci. 2007. V. 8(8). P. 583–596.

McCauley D.W., Docker M.F., Whyard S. et al. Lampreys as Diverse Model Organisms in the Genomics Era // Bioscience. 2015. V. 65(11). P. 1046–1056.

McMahon J.A., Takada S., Zimmerman L.B. et al. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite // Genes. Dev. 1998. V. 12. P. 1438–1452.

Medina L. Evolution and Embryological Development of Forebrain // Encyclopedia of Neuroscience / Eds. Binder M.D., Hirokawa N., Windhorst U. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009.

Medina L., Abellan A. Development and evolution of the pallium // Semin. Cell Dev. Biol. 2009. V. 20(6). P. 698–711.

Mehta T.K., Ravi V., Yamasaki S. et al. Evidence for at least six *Hox* clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 16044–16049.

Meléndez-Ferro M., Villar-Cheda B., Abalo X.M. et al. Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: comparative immunocytochemical study // J. Comp. Neurol. 2002. V. 442. № 3. P. 250–265.

Moreau M., Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium // Int. J. Dev. Biol. 2004. V. 48(2–3). P. 75–84.

Murakami Y., Uchida K., Rijli F.M. et al. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans // Dev. Biol. 2005. V. 280(2). P. 249–259.

Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F. et al. Identification and expression of the lamprey *Pax6* gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates // Development. 2001. V. 128(18). P. 3521–3531.

Myojin M., Ueki T., Sugahara F. et al. Isolation of *Dlx* and *Emx* gene cognates in an agnathan species, *Lampetra japonica*, and their expression patterns during embryonic and larval development: conserved and diversified regulatory patterns of homeobox genes in vertebrate head evolution // J. Exp. Zool. 2001. V. 291(1). P. 68–84.

Neidert A.H., Virupannavar V., Hooker G.W. et al. Lamprey *Dlx* genes and early vertebrate evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98(4). P. 1665–1670.

Nomura T., Murakami Y., Gotoh H. et al. Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes // Neurosci. Res. 2014. V. 86. P. 25–36.

Nord A.S., Pattabiraman K., Visel A. et al. Genomic perspectives of transcriptional regulation in forebrain development // Neuron. 2015. V. 85(1). P. 27–47.

Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Berlin, Germany: Springer, 1970.

Oisi Y., Ota K.G., Kuraku S. et al. Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates // Nature. 2013. V. 493(7431). P. 175–180.

Osório J., Rétaux S. The lamprey in evolutionary studies // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218(5). P. 221–235.

Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K. et al. Concise review: *Pax6* transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // Stem Cells. 2008. V. 26. P. 1663–1672.

Ota, K.G., Kuraku, S., Kuratani S., Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest // Nature. 2007. V. 446. P. 672–675.

Pani A.M., Mullarkey E.E., Aronowicz J. et al. Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signalling centres // Nature. 2012. V. 483. P. 289–294.

Piccolo S., Agius E., Leyns L. et al. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of nodal, BMP and Wnt signals // Nature. 1999. V. 397(6721). P. 707–710.

Puelles L., Rubenstein J.L.R. A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model // Front. Neuroanat. 2015. V. 9. P. 27.

Puelles L., Ferran J.L. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament // Front. Neuroanat. 2012. V. 6. P. 47.

Putnam N.H., Butts T. Ferrier D.E.K. et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype // Nature. 2008. V. 453. P. 1064–1071.

Putnam N.H., Butts T., Ferrier D.E. et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype // Nature. 2008. V. 453. P. 1064–1071.

Reese D.E., Hall C.E., Mikawa T. Negative regulation of midline vascular development by the notochord // Dev. Cell. 2004. V. 6. P. 699–708.

Renaud C.B. Lampreys of the world. An annotated and illustrated catalogue of lamprey species known to date // FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. 2011. V. 5. P. 109.

Retaux S., Kano S. Midline signaling and evolution of the forebrain in chordates: A focus on the lamprey hedgehog case // Integrative and Comparative Biology. 2010. V. 50. P. 98–109.

Rodriguez-Seguel E., Alarcon P., Gomez-Skarmeta J.L. The Xenopus Irx genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors Fezf and Arx // Dev. Biol. 2009. V. 329. P. 258–268.

Scholpp S., Foucher I., Staudt N. et al. Otx1l, Otx2 and Irx1b establish and position the ZLI in the diencephalons // Development. 2007. V. 134. P. 3167–3176.

Schubert M., Holland N.D., Laudet V. et al. A retinoic acid-Hox hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus // Dev. Biol. 2006. V. 296. P. 190–202.

Sestak M.S., Domazet-Loso T. Phylostratigraphic profiles in zebrafish uncover chordate origins of the vertebrate brain // Mol. Biol. Evol. V. 201532. P. 299–312.

Slack J.M., Tannahill D. Noggin the dorsalizer // Nature. 1993. V. 361. P. 498–499.

Smith W.C., Knecht A.K., Wu M. et al. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm // Nature. 1993. V. 361. P. 547–549.

Smith W.C., Harland R.M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann orginizer in Xenopus embryos // Cell. 1992. V. 70. P. 829–840.

Streit A., Berliner A.J., Papanayotou C. et al. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation // Nature. 2000. V. 406(6791). P. 74–78.

Suda Y., Kurokawa D., Takeuchi M. et al. Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head // Dev. Biol. 2009. V. 325(1). P. 282–295.

Sugahara F., Pascual-Anaya J., Oisi Y. et al. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain // Nature. 2016. V. 531. P. 97–100.

Sugahara F., Murakami Y., Pascual-Anaya J. et al. Reconstructing the ancestral vertebrate brain // Dev. Growth Differ. 2017. V. 59(4). P. 163–174.

Sussel L., Marin O., Kimura S. et al. Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum // Development. 1999. V. 126. P. 3359–3370.

Suzuki D.G., Murakami Y., Escriva H. et al. A comparative examination of neural circuit and brain patterning between the lamprey and amphioxus reveals the evolutionary origin of the vertebrate visual center // J. Comp. Neurol. 2015. V. 523. № 2. P. 251–261.

Tahara Y. Normal stages of development in the lamprey, Lampetra reissneri (Dybowski) // Zoological Science. 1988. V. 5. P. 109–118.

Takahashi H., Liu F.C. Genetic patterning of the mammalian telencephalon by morphogenetic molecules and transcription factors // Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today. 2006. V. 78(3). P. 256–266.

Tank E.M., Dekker R.G., Beauchamp K. et al. Patterns and consequences of vertebrate *Emx* gene duplications // Evol. Dev. 2009. V. 11(4). P. 343–353.

Taverna E., Gotz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 465–502.

Thomas P., Beddington R. Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo // Curr. Biol. 1996. V. 6(11). P. 1487–1496.

Tomsa J.M., Langeland J.A. Otx expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the vertebrate head and jaw // Dev. Biol. 1999. V. 1; 207(1). P. 26–37.

Toresson H., Maritnez-Barbera J.P., Beardsley A. et al. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon // Dev. Genes Evol. 1998. V. 208. P. 431–439.

Vieira C., Pombero A., Garcia-Lopez R. et al. Molecular mechanisms controlling brain development: An overview of neuroepithelial secondary organizers // Int. J. Dev. Biol. 2010. V. 54. P. 7–20.

Wada H., Saiga H. Satoh N. et al. Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of the placodes: Insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *Hox*, and *Otx* genes // Development. 1998. V. 125. P. 1113–1122.

Warren S.M., Brunet L.J., Harland R.M. et al. The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion // Nature. 2003. V. 422. P. 625–629.

Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A. et al. Direct differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // Nature Neuroscience. 2005. V. 8. P. 288–296.

Wilson P.A., Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4 // Nature. 1995. V. 376(6538). P. 331–333.

Wilson S.I., Rydstrom A., Trimborn T. et al. The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo // Nature. 2001. V. 411(6835). P. 325–330.

Wilson S.W., Houart C. Early steps in the development of the forebrain // Dev. Cell. 2004. V. 6(2). P. 167–181.

Wullimann M.F., Mueller T., Distel M. et al. The long adventurous journey of rhombic lip cells in jawed vertebrates: a comparative developmental analysis // Front. Neuroanat. 2011. V. 5. P. 27.

Xanthos J.B., Kofron M., Tao Q. et al. The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer // Development. 2002. V. 129(17). P. 4027–4043.

Yang X.U., Si-Wei Z.H.U., Qing-Wei L.I. Lamprey: a model for vertebrate evolutionary research // Dongwuxue Yanjiu. 2016. V. 37(5). P. 263–269.

Zaraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L. et al. A novel homeobox gene expressed in the anterior neural plate of the *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1992. V. 152. P. 373–382.

Zhang H., Ravi V., Tay B.H. et al. Lampreys, the jawless vertebrates, contain only two *ParaHox* gene clusters // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114(34). P. 9146–9151.

Genetic Mechanisms of the Early Development of the Telencephalon as a Reflection of the History of the Appearance and Evolution of This Unique Department of the Central Nervous System of Vertebrates

A. V. Bayramov[1,*], G. V. Ermakova[1], and A. G. Zaraisky[1]

[1]Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

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

One of the most important aromorphoses in the evolution of vertebrates was the emergence of a complex structured telencephalon – a rostral part of the forebrain, which, developing and improving in evolution, provided the possibility of realizing higher forms of nervous activity observed in animals and humans. The laying of the telencephalon occurs at the earliest stages of vertebrate ontogenesis, when the anterior part of the neural tube differentiates into three cerebral vesicles: prozencephalon, as an embryo of the future forebrain, mesencephalon – the future midbrain and rhombencephalon – the future hindbrain. The forebrain further differentiates, forming the terminal brain (telencephalon) and the diencephalon (diencephalon). The development of brain structures and regions is modulated by the expression of appropriate regulatory genes encoding transcription factors and signaling molecules. Issues of the appearance in the evolution and ontogenesis of the telencephalon, being today one of the central in modern developmental biology, at the molecular level remain still poorly studied. Recently, when studying the evolutionary mechanisms that ensure the appearance of the telencephalon in vertebrates, much attention is paid to the most evolutionarily ancient groups of vertebrates, such as cyclostomes (lampreys and myxines) and the closest relatives of vertebrates – *Tunicata* (ascidians) and *Cephalochordata* (lancelets). Of particular interest in these studies are cyclostomes, since it is the representatives of vertebrates in which telencephalon appears for the first time in evolution as a separate morphological structure, and there is reason to believe that they could retain expression patterns and regulatory mechanisms characteristic of vertebrate ancestors. In this review we summarize and analyze the data accumulated in recent years on studies of the genetic mechanisms of the early development of the telencephalon in lower vertebrates and the results of the search for homologues of this structure in vertebrate-related chordate groups – skulls and membranes.

Keywords: telencephalon, prosencephalon, neural induction, cranial, cyclostomes, lampreys, vertebrates, development of the telencephalon, early embryonic differentiation

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 210–217

ОБЗОРЫ

УДК 577.21,576.385.5

ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАТОРА ЗИГОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА DUX4 В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2020 г. А. А. Карпухина[a, b, c, d], Е. С. Васецкий[a, b, *]

[a]*CNRS UMR9018, Université Paris-Sud Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France*

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

[c]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, ул. Ленинские горы, 1 (40), Москва, 119234 Россия*

[d]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, ул. Ленинские Горы, 1 (73), Москва, 119234 Россия*

**e-mail: yegor.vassetzky@cnrs.fr*

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.
После доработки 12.02.2020 г.
Принята к публикации 14.02.2020 г.

Геном зиготы сразу после оплодотворения не транскрибируется. В этот период происходит его перепрограммирование, которое обеспечивает переход дифференцированной половой клетки в тотипотентное состояние и зависит от РНК и белков, накопленных в ооците. За перепрограммированием следует активация зиготического генома (АЗГ). Один из ключевых регуляторов АЗГ у человека – ген *DUX4*, кодирующий транскрипционный фактор с двумя гомеобоксами. Его экспрессия необходима для развития эмбриона, подлежит точной временной регуляции и обычно наблюдается только на ранних стадиях дробления. В большинстве соматических тканей *DUX4* эффективно репрессируется за счет работы множества эпигенетических механизмов. Аберрантная экспрессия *DUX4* в скелетных мышцах вызывает лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию. Экспрессия *DUX4*, связанная с хромосомными перестройками, приводит к подавлению противоопухолевой иммунной активности, и наблюдается при лейкемиях и саркомах.

Ключевые слова: DUX4, активация зиготического генома, онкогенез, мышечная дистрофия

DOI: 10.31857/S0475145020030076

ВВЕДЕНИЕ

Новообразованный геном геном зиготы состоит из материнского и отцовского генетического материала, каждый из которых имеет свою хроматиновую организацию и нуждается в ремоделировании до открытого состояния, прежде чем его можно будет транскрибировать. Перепрограммирование зиготы происходит сразу после оплодотворения, пока ее геном транскрипционно неактивен. Оно осуществляется за счет РНК и белков, накопленных в яйцеклетке до оплодотворения и обеспечивает переход геномов яйцеклетки и сперматозоида, сформировавших зиготу, в тотипотентное состояние (Newport, Kirschner, 1982; Tadros, Lipshitz, 2009). Впоследствии это приводит к образованию различных типов клеток и тканей. За перепрограммированием следует процесс, известный как переход от материнского типа экспрессии генов к зиготическому (МЗП) (Tadros, Lipshitz, 2009). МЗП включает в себя активацию зиготического генома (АЗГ) и постепенную деградацию продуктов материнского происхождения. После МЗП новообразованный геном зиготы берет на себя полный контроль над транскрипцией в развивающемся эмбрионе.

Механизмы, определяющие начало АЗГ, изучены не полностью. Известно, что АЗГ частично регулируется изменением ядерно-цитоплазматического отношения (Newport, Kirschner, 1982): его повышение способствует титрованию изначально имеющихся в яйцеклетке неспецифических репрессоров, ингибирующих транскрипцию ДНК (Amodeo et al., 2015; Jevtić, Levy, 2015, 2017; Joseph et al., 2017). Быстрые клеточные циклы, присущие многим видам на ранних этапах эмбриогенеза, практически не оставляют времени для транскрипции между делениями (Rothe et al., 1992; Shermoen, O'Farrell, 1991). Начало АЗГ становится возможным по мере замедления деления и удлинения клеточного цикла (Kimelman et al., 1987). В значительной степени АЗГ связана с ремоделированием хроматина. Кроме того, требуется время для полиаденилирования, трансляции и накопления в клетке основных транскрипционных факторов, унаследованных в виде материнской мРНК и необходимых для АЗГ (Veenstra et al., 1999; Guven-Ozkan et al., 2008). В данном обзоре мы рассмотрим семейство транскрипционных факторов DUX, участвующих в АЗГ млекопитающих (De Iaco et al., 2017).

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНА *DUX*

Семейство генов *DUX* представлено безинтронными *DUX4* у приматов и афротерий (слоны, даманы, тенреки) и *Dux* у мышей и крыс, а также интрон-содержащими *Duxa*, *Duxb* и *Duxc* у других млекопитающих (Leidenroth et al., 2012). Еще один интрон-содержащий вариант, *Duxbl* (DUXB-like), встречается только у мышей и крыс, хотя его псевдогенные формы были найдены и у приматов (Leidenroth, Hewitt, 2010). *DUX4* присутствует в геноме человека во множестве копий, которые организованы в крупные (3.3 кб) макросателлитные тандемные повторы – D4Z4, расположенные в субтеломерных областях хромосом 4q и 10q (Gabriëls et al., 1999). Повторы D4Z4 присутствуют и в других участках человеческого генома в виде отдельных копий. В геноме мыши ген *Dux* также представлен множеством копий и организован в аналогичные повторы размером 4.9 кб (Clapp et al., 2007).

Все белки DUX обладают двумя ДНК-связывающими гомеодоменами (ГД1 и ГД2), разделенными линкером. Хотя гомеодомены обычно связывают ДНК в виде димера, присутствие сразу нескольких гомеодоменов в одном белке довольно необычно и не наблюдается вне группы плацентарных млекопитающих (Eutheria). Помимо гомеодоменов ряд белков DUX (Duxc, Dux и DUX4) имеют консервативный С-концевой трансактивирующий домен (Leidenroth, Hewitt, 2010; Mitsuhashi et al., 2018).

Согласно современной эволюционной модели, семейство DUX появилось после дупликации части гена, содержащего единственный гомеобокс (Leidenroth, Hewitt, 2010). В результате появился новый ген с двумя тандемно расположенными гомеобоксами (Lee et al., 2018). Последний общий предок всех плацентарных млекопитающих, вероятно, имел ген с двумя гомеобоксами – *Duxc*. Гены *DUX4* и *Dux* возникли позднее в результате множественных независимых ретротранспозиций (Leidenroth et al., 2012).

Два гомеодомена DUX принадлежат к ветви семейства гомеодоменов PAX (Paired-homeobox), но их сходство друг с другом гораздо сильнее, чем с любым из других PAX-гомеодоменов. Это подтверждает гипотезу о том, что семейство DUX, скорее всего, выделилось именно в результате дупликации в последовательности гена, предкового для всех эутерий (Leidenroth et al., 2012; Lee et al., 2018). Современным гомологом этого предкового гена, вероятно, является содержащий один гомеобокс ген *sDUX*, обнаруженный у неплацентарных млекопитающих (Leidenroth, Hewitt, 2010).

DUX4 является транскрипционным фактором. Он связывается с определенной последовательностью ДНК посредством гомеодоменов и благодаря трансактивирующему домену активирует экспрессию ряда генов. Консенсусная последовательность, которую узнает DUX4 в геноме человека – 5'-TAATCTAATCA-3' (Geng et al., 2012; Yu Zhang et al., 2016). Поскольку ГД1 и ГД2 DUX4 имеют высокий уровень сходства, изначально предполагалось, что они связывают два одинаковых мотива – TAAT, располагаясь относительно друг друга в ориентации “голова к хвосту” (Dong et al., 2018), однако недавняя расшифровка кристаллической структуры N-концевой части белка DUX4 (остатки 15–155, включающие оба гомеодомена DUX4) в комплексе со своим ДНК-консенсусом показала, что ГД1 и ГД2 связывают разные мотивы – 5'-TAAT-3' и 5'-TGAT-3' соответственно, и ориентируются при этом “голова к голове” (Lee et al., 2018).

ГЕНЫ *DUX* И АЗГ

Будучи транскрипционным фактором, DUX4 активирует экспрессию нескольких сотен генов. Гены-мишени DUX (человеческого DUX4 и мышиного Dux) экспрессируются до активации зиготы в составе первой (минорной) волны АЗГ. Предполагается, что факторы транскрипции DUX являются ключевыми индукторами АЗГ у млекопитающих (De Iaco et al., 2017; Hendrickson et al., 2017). РНК *DUX4* была обнаружена начиная со стадии ооцита и вплоть до стадии четырех клеток (4С). Экспрессия предполагаемых мишеней DUX4 (например, *ZSCAN4, ZFP352*, эндогенных ретровирусных элементов – MERVL у мышей и HERVL у человека) детектируются начиная с двухклеточной стадии (2С), а к стадии восьми клеток (8С), соответствующей основной волне АЗГ у человека (Vassena et al., 2011), достигает пика (De Iaco et al., 2017).

Эктопическая экспрессия *Dux* в эмбриональных стволовых клетках мыши (mESCs) переводит их в состояние, характерное для эмбрионов на стадии двух бластомеров (2С). Клетки mESCs, экспрессирующие *Dux,* реактивируют экспрессию генов двухклеточной стадии, теряют ассоциированный с плюрипотентностью белок POU5F1 и хромоцентры, а также приобретают хроматиновый ландшафт, характерный для двухклеточных эмбрионов (Hendrickson et al., 2017). С другой стороны, было показано, что нокаут гена *Dux* в зиготах мышей *ex vivo* “замораживает” зиготы на стадии 2С: такие зиготы не проявляли специфических для АЗГ транскрипционных изменений и не могли формировать морулу/бластоцисту (De Iaco et al., 2017).

Тем не менее, более поздние исследования показывают, что деплеция Dux *in vivo* гораздо менее фатальна, и даже полная потеря *Dux* не является препятствием для развития эмбрионов мыши (Chen, Zhang, 2019; Guo et al., 2019). Гомозиготные *Dux*$^{-/-}$ мыши хоть и рождаются с частотой несколько меньше ожидаемой по менделевскому распределению, доживают до взрослого возраста, демонстрируя лишь незначительное снижение репродуктивного потенциала. Транскриптомы *Dux*$^{-/-}$ эмбрионов в конце стадий 1С и 2С существенно не отличаются от транскриптомов эмбрионов мышей дикого типа (Chen, Zhang, 2019). Анализ транскрипционного профиля 2С-эмбрионов на ранней, средней и поздней 2С стадиях показывает, что хотя на ранней 2С подмножество АЗГ-генов действительно имеют пониженную экспрессию в *Dux*$^{-/-}$ эмбрионах (по сравнению с ранней 2С в эмбрионах дикого типа), экспрессия этих генов резко повышается к концу 2С стадии (по сравнению с ранней 2С стадией в нокаутных эмбрионах), что указывает на то, что их транскрипция хоть и отложенно, но активируется даже в отсутствие Dux (Guo et al., 2019). Эти данные позволяют предположить, что Dux – важный, но не необходимый фактор АЗГ, и является, вероятно, не инициатором, а ко-активатором экспрессии. В двухклеточных эмбрионах мыши помимо Dux имеется ряд других транскрипционных факторов и/или модуляторов хроматина, способных обеспечить успешное протекание АЗГ, а модельная система на основе эмбриональных клеток *ex vivo*, по-видимому, не оптимальна для исследований тотипотентных стадий. Кроме того, транскрипция Dux не обнаруживается у эмбрионов мышей после поздней стадии 2С (Deng et al., 2014; Guo et al., 2019). Инъекция мРНК *Dux* в бластомеры мышей в конце стадии 2С приостанавливает их развитие, главным образом, на стадии четырех клеток (Guo et al., 2019). Остановившиеся в развитии эмбрионы имеют высокие уровни экспрессии *Zscan4* и MERVL, что является признаком 2С-стадии. Таким образом, экспрессия *DUX4* характерна для эмбриона на стадии двух клеток и, вероятно, ускоряет наступление АЗГ, однако для правильного развития эмбриона необходима ее точная временная регуляция.

ПОСТ-ЗИГОТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *DUX4* И ЕГО ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Механизмы, обеспечивающие подавление *DUX* в определенный момент эмбриогенеза и его дальнейшее подавление в тканях взрослого организма изучены не до конца, хотя важность репрессии *DUX4* в соматических тканях не вызывает сомнений. У взрослых людей *DUX4* обычно экспрессируется только в яичках (Snider et al., 2010) и, предположительно, тимусе (Das, Chadwick, 2016), а его патологическая экспрессия в других тканях связана с лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией (ЛЛПМД), В-клеточным лейкозом (Dib et al., 2019), подавлением противоопухолевой иммунной активности и резистентностью к противоопухолевой терапии (Chew et al., 2019).

Считается, что экспрессия *DUX4* у человека репрессируется эпигенетически. Ген *DUX4* встроен в массив из макросателлитов D4Z4, расположенный в субтеломерной области 4-й хромосомы (4q35). Этот массив имеет полиморфный размер: он содержит от 11 до 200 единиц повтора D4Z4 длиной 3.3 кб. Каждый повтор содержит открытую рамку считывания гена *DUX4*. Репрессия осуществляется посредством метилирования ДНК D4Z4, модификации гистонов и связывания репрессивных белков хроматина. Активность тандемных повторов в геноме тщательно контролируется, и если их количество превышает определенный порог, они репрессируются (Mitsuda, Shimizu, 2016). Поэтому большой размер массива D4Z4 необходим для эффективного подавления экспрессии *DUX4* в соматических клетках.

Уменьшение количества повторов D4Z4 в массиве на 4-й хромосоме вызывает аутосомно-доминантное генетическое заболевание – лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию 1 типа (ЛЛПМД1). Индивидуумы с ЛЛПМД1 имеют меньшее количество повторов D4Z4 (от 1 до 10), что обеспечивает более открытое состояние хроматина. Также для них характерен аллель 4qA, в котором содержится функциональный сигнал полиаденилирования, стабилизирующий мРНК *DUX4*.

Пациенты с ЛЛПМД2, формой заболевания, не зависящей от количества повторов D4Z4 и составляющей ~5% от общего числа случаев ЛЛПМД (de Greef et al., 2010), обладают нормальным количеством повторов D4Z4, но несут мутации в гене *SMCHD1*. Продукт этого гена вовлечен в метилирование ДНК, и его мутация приводит к неполному метилированию массива D4Z4 (Dion et al., 2019) и релаксации хроматина, позволяющей экспрессировать *DUX4*.

Примечательно, что одной релаксации хроматина и начала экспресси *DUX4* недостаточно для развития болезни, поскольку мРНК *DUX4* подвергается альтернативному сплайсингу. Исходная мРНК *DUX4* имеет 2 участка сплайсинга в 3' UTR, генерирующих 2 транскрипта DUX4fl, кодирующие полноразмерный белок DUX4 (Dixit et al., 2007; Snider et al., 2009), но эти транскрипты крайне нестабильны и подвергаются дальнейшему сплайсингу. В результате получается дополнительный транскрипт – DUX4s, кодирующий белок, сохраняющий ДНК-связывающие гомеодомены, но не имеющий С-концевого домена трансактивации, главным образом отвечающего за цитотоксичность (Snider et al., 2010). Транскрипты и белок DUX4s присутствуют как у пациентов с ЛЛПМД, так и у здоровых людей, и не вызывают мышечной патологии. Гаплотип 4qA, ассоциированный с заболеванием, создает функциональный участок полиаденилирования в последнем дистальном повторе D4Z4 и необходим для развития как ЛЛПМД1, так и ЛЛПМД2. Полиаденилирование стабилизирует DUX4fl, что позволяет производить полноразмерный цитотоксический белок.

Интересно, что массив повторов, на 99% гомологичный D4Z4, есть и на 10-й хромосоме. При этом на его дистальной границе не обнаружено канонического сигнала полиаденилирования. Уменьшение количества повторов D4Z4 на 10-й хромосоме не приводит к патологии, что подчеркивает важность хромосомного окружения в патогенезе ЛЛПМД. Недавнее исследование показало, что обмен субтеломерными участками хромосом 4q и 10q, индуцированный CRISPR-Cas, приводит к частичной коррекции патологических изменений в мышечных клетках больных ЛЛПМД (Ma et al., personal communication).

При некоторых патологиях, включая лейкемию, саркому Юинга и рабдомиосаркому, транслокации с участием 4-й хромосомы приводят к появлению модифицированных форм белка DUX4 или его слиянию с другими белками. При остром лимфобластном лейкозе (ALL) перенос гена *DUX4* в локус тяжелой цепи иммуноглобулина (IGH) на 14-й хромосоме (Lilljebjörn et al., 2016; Yasuda et al., 2016) приводит к образованию DUX4 с укороченным С-концом. Перенос *DUX4* в интрон онкогена *ERG* приводит к образованию химерного белка ERG-DUX4 (Sirvent et al., 2009). В опухолевых клетках саркомы Юинга хромосомная транслокация t(4;19)(q35;q13) приводит к слиянию С-концевой области *DUX4* с геном *CIC* и выработке химерного белка CIC-DUX4. Транслокация t(4;22)(q35;q12), связанная с эмбриональной РМС, приводит к выработке химерного белка EWSR1-DUX4 (Sirvent et al., 2009). Экспрессия *DUX4* после хромосомных перестроек, вероятно, обусловлена присутствием контрольных элементов в локусах, в которые он встроился. Эти локусы также содержат сигналы полиаденилирования, необходимые для стабилизации мРНК *DUX4*.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4 ПРИ ЛЛПМД И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

DUX4 является транскрипционным фактором, поэтому его аберрантная экспрессия в миобластах (Dixit et al., 2007; Kowaljow et al., 2007; Snider et al., 2010), биопсиях пациентов с ЛЛПМД (Snider et al., 2010) и во время эмбрионального развития у больных ЛЛПМД (Ferreboeuf et al., 2014) может иметь серьезные последствия для клеток. Действительно, повышенная экспрессия *DUX4* вызывает следующие эффекты: увеличение чувствительности клеток к окислительному стрессу (Winokur et al., 2003; Bosnakovski et al., 2008; Barro et al., 2010; Bou Saada et al., 2016); атрофию миосимпластов, опосредованную индукцией *ATROGIN1* и *MURF1* (Vanderplanck et al., 2011); апоптоз за счет активации путей каспазы-3 (Kowaljow et al., 2007) и транскрипционного фактора p53 (Wallace et al., 2011). *DUX4* также вызывает аномалии миогенной дифференцировки (Dmitriev et al., 2013) со снижением уровня экспрессии *MYOD* (Winokur et al., 2003; Celegato et al., 2006). Кроме того, DUX4 индуцирует экспрессию эмбриональных генов (Geng et al., 2012). Один из них – *PITX1*, ген фактора транскрипции гомеодоменов парного типа (Dixit et al., 2007). Этот ген участвует в сегментации эмбриона и развитии задних конечностей (Szeto et al., 1999), контролируя морфологию их мышц, сухожилий и костей (DeLaurier et al., 2006). Повышенная экспрессия *PITX1* вызывает атрофию скелетных мышц у мышей (Pandey et al., 2012).

В настоящее время роль DUX4 в развитии лейкемии до конца не выяснена. Тем не менее, было показано, что DUX4 ингибирует экспрессию гена *ERG* дикого типа путем активации негативно-доминантной изоформы ERGalt, которая необходима для лейкемогенеза и увеличивает транскрипционную активность в регионе, делая его более чувствительным к мутациям (Zhang et al., 2016). Экспрессия *DUX4* вызывает повреждения ДНК (Dmitriev et al., 2016), что также может приводить к делеции *ERG* при лейкемии. Более того, экспрессия гена *IGH-DUX4* (но не гена *DUX4*) в предшественниках В клеток иммунодефицитных мышей приводила к В-клеточному лейкозу. Это показывает, что DUX4 приобретает онкогенный потенциал после хромосомной перестройки (Yasuda et al., 2016).

При саркоме Юинга *DUX4* сливается с геном *CIC*, кодирующим транскрипционный репрессор, участвующий в регуляции сигнального пути RTK/ERK (Tseng et al., 2007; Jin et al., 2015). Химерный белок CIC-DUX4 проявляет сильную транскрипционную активность и индуцирует экспрессию генов группы транскрипционных факторов *PEA3* (Kawamura-Saito et al., 2006). Белки PEA3 регулируют несколько генов, вовлеченных в процесс опухолеобразования, например, матричные металлопротеиназы, которые играют важную роль в метастазировании (de Launoit et al., 2006).

При эмбриональной рабдомиосаркоме транслокация приводит к слиянию *DUX4* с *EWSR1* (Sirvent et al., 2009). Это напоминает ситуацию, наблюдаемую при саркоме Юинга, когда ген другого транскрипционного фактора, *ERG*, сливается с геном *EWSR1* (Ida et al., 1995). Опасность такого типа транслокации заключается в выработке химерного белка с аберрантными свойствами.

Помимо хромосомных перестроек с участием гена *DUX4,* обнаруженных при различных формах саркомы и лейкоза, эпигенетические изменения локуса 4q35, в котором находится ген *DUX4,* были описаны и при других видах онкологических заболеваний (Tsumagari et al., 2008; Katargin et al., 2009). Исследование, сравнивающее экспрессию генов при ЛЛПМД с профилями экспрессии при 35 различных видах опухолей, показало, что при ЛЛПМД активно экспрессируются гены, характерные для онкологических заболеваний (Dmitriev et al., 2014). Интересно, что транскриптом ЛЛПМД наиболее сильно напоминает транскриптом клеток саркомы Юинга. Часто наблюдаемые у пациентов с ЛЛПМД воспаление, фиброз, окислительный стресс и повреждение ДНК (Arahata et al., 1995; Barro et al., 2010; Dmitriev al., 2016; Dmitriev et al., 2016) могут объяснять сходство между профилями экспрессии ЛЛПМД и раковых клеток.

DUX4 может способствовать онкогенезу через многочисленные мишени, многие из которых, как и сам DUX4, принимают участие в программе раннего развития, и, таким образом, их экспрессия характерна для тотипотентных клеток. Например, ZSCAN4, белок необходимый для удлинения теломер в эмбриональных стволовых клетках (Zalzman et al., 2010), активен во многих опухолях, экспрессирующих *DUX4*, что, возможно, способствует их пролиферации. Другая мишень DUX4 – CCNA (циклин A), который участвует в сперматогенезе (Liu et al., 1998). CCNA аномально экспрессируется в миелоидных и недифференцированных гематологических злокачественных опухолях (Krämer et al., 1998). При его повышенной экспрессии у мышей нарушается миелопоэз и развивается острый миелоидный лейкоз (Liao et al., 2001).

Наконец, DUX4 связан с подавлением противоопухолевой иммунной активности. Опухоли, экспрессирующие *DUX4*, характеризуются низкой аутоцитолитической активностью, которая связана с распознаванием цитотоксическими Т-клетками антигенов в составе комплекса гистосовместимости (MHC) I класса. Экспрессия *DUX4* ингибирует экспрессию MHC1, что приводит к подавлению презентации антигенов на поверхности раковых клеток (Chew et al., 2019). Транскриптомные данные, полученные от больных с метастатической меланомой, получавших противоопухолевую терапию антителами против CTLA-4 (Van Allen et al., 2015), выявили повышенную экспрессию *DUX4* у пациентов, не реагирующих на препарат, по сравнению с отвечающими на терапию пациентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

DUX4 – фактор эмбриональной транскрипции, участвующий в АЗГ млекопитающих. Он экспрессируется на ранних стадиях эмбриогенеза и должен быть репрессирован в соматических тканях взрослого организма. Аномальная постнатальная экспрессия DUX4 активизирует программу раннего развития, характерную для тотипотентных клеток и вызывает нарушения регуляции экспрессии множества генов и клеточной дифференцировки. Это приводит к развитию ЛЛПМД и ряда онкологических заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была поддержана грантом AFM (CTCFSHD), Программой Президиума РАН № 42 “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий” и Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. ГЗ 0108-2020-0008.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Amodeo A.A., Jukam D., Straight A.F., Skotheim J.M. Histone titration against the genome sets the DNA-to-cytoplasm threshold for the Xenopus midblastula transition // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. V. 112. №10. P. E1086–E1095.

Arahat K., Ishihara T., Fukunaga H., Orimo S., Lee J.H., Goto K., Nonaka I. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses // Muscle & Nerve. 1995. V. 18. P. S56–S66.

Barro M., Carnac G., Flavier S., Mercier J., Vassetzky Y., Laoudj-Chenivesse D. Myoblasts from affected and nonaffected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. // J. Cellular and Molecular Medicine. 2010. V. 14. № 1–2. P. 275–289.

Bosnakovski D., Xu Z., Gang E.J., Galindo C.L., Liu M., Simsek T., Garner H.R., Agha-Mohammadi S., Tassin A., Co Pée F., Belayew A. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies // The EMBO J. 2008. V. 27. № 20. P. 2766–2779.

Celegato B., Capitanio D., Pescatori M., Romualdi C., Pacchioni B., Cagnin S., Viganò A., Colantoni L., Begum S., Ricci E., Wait R. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes // Proteomics. 2006. V. 6. № 19. P. 5303–5321.

Chen Z., Zhang Y. Loss of DUX causes minor defects in zygotic genome activation and is compatible with mouse development // Nature Genetics. 2019. V. 51. № 6. P. 947–951.

Chew G.L., Campbell A.E., De Neef, E., Sutliff N.A., Shadle S.C., Tapscott S.J., Bradley R.K. DUX4 su Presses MHC class I to promote cancer immune evasion and resistance to checkpoint blockade. // Developmental Cell. 2019. V. 50. № 5. P. 658–671.

Cla P J., Mitchell L.M., Bolland D.J., Fantes J., Corcoran A.E., Scotting P.J., Armour J.A., Hewitt J.E. Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy // The American J. Human Genetics. 2007. V. 81. № 2. P. 264–279.

Das S., Chadwick B.P. Influence of repressive histone and DNA methylation upon D4Z4 transcription in non-myogenic cells // PLoS One. 2016. V. 11. № 7. e0160022.

De Iaco A., Planet E., Coluccio A., Verp S., Duc J., Trono D. DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals // Nature Genetics. 2017. V. 49. № 6. P. 941.

DeLaurier A., Schweitzer R., Logan M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb // Developmentl Biology. 2006. V. 299. № 1. P. 22–34.

Deng Q., Ramsköld, D., Reinius B., Sandberg R. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells // Science. 2014. V. 343. № 6167. P. 193–196.

Dib C., Zakharova V., Popova E., Kiseleva E., Chernyak B., Lipinski M., Vassetzky Y.S. DUX4 pathological expression: causes and consequences in cancer // Trends in Cancer. 2019. V. 5. № 5. P. 268–271.

Dion C., Roche S., Laberthonnière C., Broucqsault N., Mariot V., Xue S., Gurzau A.D., Nowak A., Gordon C.T., Gaillard M.C., El-Yazidi C. SMCHD1 is involved in de novo methylation of the DUX4-encoding D4Z4 macrosatellite // Nucleic Acids Research. 2019. V. 47. № 6. P. 2822–2839.

Dixit M., Ansseau E., Tassin A., Winokur S., Shi R., Qian H., Sauvage S., Mattéotti C., van Acker A.M., Leo O., Figlewicz D. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. V. 104. № 46. P. 18157–18162.

Dmitriev P., Saada Y.B., Dib C., Ansseau E., Barat A., Hamade A., Dessen P., Robert T., Lazar V., Louzada R.A., Dupuy C. DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients // Free Radical Biology and Medicine. 2016. V. 99. P. 244–258.

Dmitriev P., Kairov U., Robert T., Barat A., Lazar V., Carnac G., Laoudj-Chenivesse D., Vassetzky Y.S. Cancer-related genes in the transcription signature of facioscapulohumeral dystrophy myoblasts and myotubes // J. Cellular and Molecular Medicine. 2014. V. 18. № 2. P. 208–217.

Dmitriev P., Kiseleva E., Kharchenko O., Ivashkin E., Pichugin A., Dessen P., Robert T., Co Pée F., Belayew A., Carnac G., Laoudj-Chenivesse D. Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis // Oncotarget. 2016. V. 7. № 40. P. 65090.

Dmitriev P., Stankevicins L., Ansseau E., Petrov A., Barat A., Dessen P., Robert T., Turki A., Lazar V., Labourer E., Belayew A. Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 49. P. 34989–35002.

Dong X., Zhang W., Wu H., Huang J., Zhang M., Wang P., Zhang H., Chen Z., Chen S.J., Meng G. Structural basis of DUX4/IGH-driven transactivation // Leukemia. 2018. V. 32. № 6. P. 1466–1476.

Ferreboeuf M., Mariot V., Bessieres B., Vasiljevic A., Attié-Bitach T., Collardeau S., Morere J., Roche S., Magdinier F., Robin-Ducellier J., Rameau P. DUX4 and DUX4 downstream target genes are expressed in fetal FSHD muscles // Human Molecular Genetics. 2014. V. 23. № 1. P. 171–181.

Gabriels J., Beckers M.C., Ding H., De Vriese A., Plaisance S., Van Der Maarel S.M., Padberg G.W., Frants R.R., Hewitt J.E., Collen D., Belayew A. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element // Gene. 1999. V. 236. № 1. P. 25–32.

Geng L.N., Yao Z., Snider L., Fong A.P., Cech J.N., Young J.M., van der Maarel S.M., Ruzzo W.L., Gentleman R.C., Tawil R., Tapscott S.J. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy // Developmental Cell. 2012. V. 22. № 1. P. 38–51.

De Greef J.C., Lemmers R.J.L.F., Camano P., Day J.W., Sacconi S., Dunand M., Van Engelen B.G.M., Kiuru-Enari S., Padberg G.W., Rosa A.L., Desnuelle C. Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 // Neurology. 2010. V. 75. V. 17. P. 1548–1554.

Guo M., Zhang Y., Zhou J., Bi Y., Xu J., Xu C., Kou X., Zhao Y., Li Y., Tu Z., Liu, K. Precise temporal regulation of Dux is important for embryo development // Cell Res. 2019. V. 29. № 11. P. 956–959.

Guven-Ozkan T., Nishi Y., Robertson S.M., Lin R. Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4 // Cell. 2008. V. 135. № 1. P. 149–160.

Hendrickson P.G., Doráis J.A., Grow E.J., Whiddon J.L., Lim J.W., Wike C.L., Weaver B.D., Pflueger C., Emery B.R., Wilcox A.L., Nix D.A. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons // Nature Genetics. 2017. V. 49. № 6. P. 925.

Ida K., Kobayashi S., Taki T., Hanada R., Bessho F., Yamamori S., Sugimoto T., Ohki M., Hayashi Y. EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor // International J. Cancer. 1995. V. 63. № 4. P. 500–504.

Jevtić P., Levy D.L. Nuclear size scaling during Xenopus early development contributes to midblastula transition timing // Current Biology. 2015. V. 25. № 1. P. 45–52.

Jevtić P., Levy D.L. Both nuclear size and DNA amount contribute to midblastula transition timing in *Xenopus laevis* // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–9.

Jin Y., Ha N., Forés M., Xiang J., Gläßer C., Maldera J., Jiménez G., Edgar B.A. EGFR/Ras signaling controls Drosophila intestinal stem cell proliferation via Capicua-regulated genes // PLoS Genetics. 2015. V. 11. № 12.

Joseph S.R., Palfy M., Hilbert L., Kumar M., Karschau J., Zaburdaev V., Shevchenko A., Vastenhouw N.L. Competition between histone and transcription factor binding regulates the onset of transcription in zebrafish embryos // Elife. 2017. V. 6. e23326.

Katargin A.N., Pavlova L.S., Kisseljov F.L., Kisseljova N.P. Hypermethylation of genomic 3.3-kb repeats is frequent event in HPV-positive cervical cancer // BMC Medical Genomics. 2009. V. 2. № 1. P. 30.

Kawamura-Saito M., Yamazaki Y., Kaneko K., Kawaguchi N., Kanda H., Mukai H., Gotoh T., Motoi T., Fukayama M., Aburatani H., Takizawa T. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation // Human Molecular Genetics. 2006. V. 15. № 13. P. 2125–2137.

Kimelman D., Kirschner M., Scherson T. The events of the midblastula transition in Xenopus are regulated by changes in the cell cycle // Cell. 1987. V. 48. № 3. P. 399–407.

Kowaljow V., Marcowycz A., Ansseau E., Conde C.B., Sauvage S., Mattéotti C., Arias C., Corona E.D., Nuñez N.G., Leo O., Wattiez, R. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein // Neuromuscular Disorders. 2007. V. 17. № 8. P. 611–623.

Krämer A., Hochhaus A., Saussele S., Reichert A., Willer A., Hehlmann R. Cyclin A1 is predominantly expressed in hematological malignancies with myeloid differentiation // Leukemia. 1998. V. 12. № 6. P. 893–898.

De Launoit Y., Baert J.-L., Chotteau-Lelievre A., Monte D., Coutte L., Mauen S., Firlej V., Degerny C., Verreman K. The Ets Transcription Factors of the PEA3 Group: Transcriptional Regulators in Metastasis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Reviews on Cancer. 2006. V. 1766. № 1. P. 79–87.

Lee J.K., Bosnakovski D., Toso E.A., Dinh T., Banerjee S., Bohl T.E., Shi K., Orellana K., Kyba M., Aihara H. Crystal structure of the double homeodomain of DUX4 in complex with DNA // Cell Reports. 2018. V. 25. № 11. P. 2955–2962.e3.

Leidenroth A., Clapp J., Mitchell L.M., Coneyworth D., Dearden F.L., Iannuzzi L., Hewitt J.E. Evolution of DUX gene macrosatellites in placental mammals // Chromosoma. 2012. V. 121. № 5. P. 489–497.

Leidenroth A., Hewitt J.E. A family history of DUX4: phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUXgene // BMC Evolutionary Biology. 2010. V. 10. № 1. P. 364.

Liao C., Wang X.Y., Wei H.Q., Li S.Q., Merghoub T., Pandolfi P.P., Wolgemuth D.J. Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. V. 98. № 12. P. 6853–6858.

Lilljebjörn H., Henningsson R., Hyrenius-Wittsten A., Olsson L., Orsmark-Pietras C., Von Palffy S., Askmyr M., Rissler M., Schrappe M., Cario G., Castor A. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia // Nature Communications. 2016. V. 7. № 1. P. 1–3.

Liu D., Matzuk M.M., Sung W.K., Guo Q., Wang P., Wolgemuth D.J. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse // Nature Genetics. 1998. V. 20. № 4. P. 377–380.

Mitsuda S.H., Shimizu N. Epigenetic repeat-induced gene silencing in the chromosomal and extrachromosomal contexts in human cells // PLoS One. 2016. V. 11. № 8. e0161288

Mitsuhashi H., Ishimaru S., Homma S., Yu B., Honma Y., Beermann M.L., Miller J.B. Functional domains of the FSHD-associated DUX4 protein // Biology Open. 2018. V. 7. № 4. bio033977.

Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 687–696.

Pandey S.N., Cabotage J., Shi R., Dixit M., Sutherland M., Liu J., Muger S., Harper S.Q., Nagaraju K., Chen Y.W. Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle dystrophy in mice // Biology Open. 2012. V. 1. № 7. P. 629–639.

Rothe M., Pehl M., Taubert H., Jäckle H. Loss of gene function through rapid mitotic cycles in the Drosophila embryo // Nature. 1992. V. 359. № 6391. P. 156–159.

Saada Y.B., Dib C., Dmitriev P., Hamade A., Carnac G., Laoudj-Chenivesse D., Lipinski M., Vassetzky Y.S. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage // Histochemistry and Cell Biology. 2016. V. 145. № 4. P. 475–483.

Shermoen A.W., O'Farrell P.H. Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts // Cell. 1991. V. 67. № 2. P. 303–310.

Sirvent N., Trassard M., Ebran N., Attias R., Pedeutour F. Fusion of EWSR1 with the DUX4 facioscapulohumeral muscular dystrophy region resulting from t(4;22)(q35;q12) in a case of embryonal rhabdomyosarcoma // Cancer Genetics and Cytogenetics. 2009. V. 195. № 1. P. 12–18.

Snider L., Asawachaicharn A., Tyler A.E., Geng L.N., Petek L.M., Maves L., Miller D.G., Lemmers R.J., Winokur S.T., Tawil R., van der Maarel S.M. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy // Human Molecular Genetics. 2009. V. 18. № 13. P. 2414–2430.

Snider L., Geng L.N., Lemmers R.J., Kyba M., Ware C.B., Nelson A.M., Tawil R., Filippova G.N., van der Maarel S.M., Tapscott S.J., Miller D.G. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene // PLoS Genetics. 2010. V. 6. № 10. e1001181.

Szeto D.P., Rodriguez-Esteban C., Ryan A.K., O'Connell S.M., Liu F., Kioussi C., Gleiberman A.S., Izpisua-Belmonte J.C., Rosenfeld M.G. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development // Genes & Development. 1999. V. 13. № 4. P. 484–494.

Tadros W., Lipshitz H.D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts // Development. 2009. V. 136. № 18. P. 3033–3042.

Tseng A.S., Tapon N., Kanda H., Cigizoglu S., Edelmann L., Pellock B., White K., Hariharan I.K. Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway // Current Biology. 2007. V. 17. № 8. P. 728–733.

Tsumagari K., Qi L., Jackson K., Shao C., Lacey M., Sowden J., Tawil R., Vedanarayanan V., Ehrlich M. Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers // Nucleic Acids Research. 2008. V. 36. № 7. P. 2196–2207.

Van Allen E.M., Miao D., Schilling B., Shukla S.A., Blank C., Zimmer L., Sucker A., Hillen U., Foppen M.H., Goldinger S.M., Utikal J. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma // Science. 2015. V. 350. № 6257. P. 207–211.

Vanderplanck C., Ansseau E., Charron S., Stricwant N., Tassin A., Laoudj-Chenivesse D., Wilton S.D., Coppee F., Belayew A. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression // PLoS One. 2011. V. 6. № 10.

Vassena R., Boué S., González-Roca E., Aran B., Auer H., Veiga A., Belmonte J.C. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development // Development. 2011. V. 138. № 17. P. 3699–3709.

Veenstra G.J., Destrée O.H., Wolffe A.P. Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in Xenopus embryos at the midblastula transition // Molecular and Cellular Biology. 1999. V. 19. № 12. P. 7972–7982.

Wallace L.M., Garwick S.E., Mei W., Belayew A., Coppee F., Ladner K.J., Guttridge D., Yang J., Harper S.Q. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy *in vivo* // Annals of Neurology. 2011. V. 69. № 3. P. 540–552.

Winokur S.T., Barrett K., Martin J.H., Forrester J.R., Simon M., Tawil R., Chung S.A., Masny P.S., Figlewicz D.A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress // Neuromuscular Disorders. 2003. V. 13. № 4. P. 322–333.

Winokur S.T., Chen Y.W., Masny P.S., Martin J.H., Ehmsen J.T., Tapscott S.J., van der Maarel S.M., Hayashi Y., Flanigan K.M. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation // Human Molecular Genetics. 2003. V. 12. № 22. P. 2895–2907.

Yasuda T., Tsuzuki S., Kawazu M., Hayakawa F., Kojima S., Ueno T., Imoto N., Kohsaka S., Kunita A., Doi K., Sakura T. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults // Nature Genetics. 2016. V. 48. № 5. P. 569.

Zalzman M., Falco G., Sharova L.V., Nishiyama A., Thomas M., Lee S.L., Stagg C.A., Hoang H.G., Yang H.T., Indig F.E., Wersto R.P. Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells // Nature. 2010. V. 464. № 7290. P. 858–863.

Zhang J., McCastlain K., Yoshihara H., Xu B., Chang Y., Churchman M.L., Wu G., Li Y., Wei L., Iacobucci I., Liu Y. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia // Nature Genetics. 2016. V. 48. № 12. P. 1481–1489.

Zhang Y., Lee J.K., Toso E.A, Lee J.S., Choi S.H., Slattery M., Aihara H., Kyba M. DNA-binding sequence specificity of DUX4 // Skeletal Muscle. 2015. V. 6. № 1. P. 8.

DUX4, a Zygotic Genome Activator, Is Involved in Oncogenesis and Genetic Diseases

A. A. Karpukhina[1, 2, 3, 4] and Y. S. Vassetzky[1, 2, *]

[1]*CNRS UMR9018, Université Paris-Sud Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France*

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

[3]*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Leninskie Gory 1 (40), Moscow, 119234 Russia*

[4]*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1 (73), Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: yegor.vassetzky@cnrs.fr*

After fertilization, the genome is transcriptionally quiescent to allow zygote reprogramming that relies on the RNA and proteins accumulated in the oocyte and ensures the transition from the differentiated germ cells to a totipotent state. Reprogramming is followed by zygotic genome activation (ZGA). *DUX4* gene encoding for a double homeobox transcription factor is one of the key ZGA drivers in humans. Its expression, essential for embryo development, is subject to precise temporal regulation and is normally observed only at early cleavage stages. *DUX4* is efficiently silenced in most somatic tissues *via* numerous epigenetic mechanisms, while its aberrant expression in skeletal muscle causes facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *DUX4* expression following chromosomal rearrangements is also observed in a subset of leukemias and sarcomas; it leads to anti-cancer immune activity suppression.

Keywords: DUX4, zygotic genome activation (ZGA), oncogenesis, muscular dystrophy

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 218–224

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

УДК 591.465.12:577.215:616.002:615.036

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИН СУКЦИНАТА (“МЕКСИДОЛ”) НА МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ, ИНТЕГРАЛЬНУЮ ЦЕЛОСТНОСТЬ ГЕНОМА, А ТАКЖЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТКАХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОГО ИММУНОКОМПЛЕКСНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

© 2020 г. Е. А. Кондрацкая[a], *, Н. Г. Грушка[a], Т. Ю. Вознесенская[a], Р. И. Янчий[a]

[a] *Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, ул. Академика Богомольца 4, Киев, 01024 Украина*

**e-mail: elena-shepel@ukr.net*

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.
После доработки 27.01.2020 г.
Принята к публикации 31.01.2020 г.

На модели экспериментального системного иммунокомплексного повреждения (индуцированного длительной иммунизацией мышей линии СВА бычьим сывороточным альбумином (БСА)) нами исследовано влияние этилметилгидроксипиридин сукцината (ГС, препарат “Мексидол”) на мейотическое созревание ооцитов, степень повреждения ДНК, а также экспрессию в кумулюсных клетках генов гремлина 1 (Grem1), гиалуронансинтазы 2 (HAS2) и циклооксигеназы 2 (COX2), которые, согласно современным данным, играют критически важную роль в оогенезе и могут характеризовать качество ооцитов. Использование ГС оказывало протективный эффект на морфо-функциональное состояние клеток яичников. Введение ГС ослабляло генотоксический стресс, индуцированный БСА, что проявлялось в уменьшении числа кумулюсных клеток с сильным повреждением ДНК. Отмечено усиление экспрессии исследованных генов: увеличение количества мРНК COX2 – в 1.61 раз и Grem1 – в 1.47 раз. Выявлено также увеличение содержания транскриптов гена HAS2 в 1.38 раз, однако эти значения не были статистически достоверными. Данные изменения положительно сказывались на мейотическом созревании ооцитов: наблюдалось существенное увеличение их количества на стадиях метафазы I и II. Таким образом, мы полагаем, что ГС может быть использован с терапевтической целью при заболеваниях иммунокомплексного генеза.

Ключевые слова: иммунизация БСА, мейотическое созревание ооцитов, интегральная целостность генома, экспрессия генов, кумулюсные клетки

DOI: 10.31857/S0475145020030039

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения, опосредованные иммунными комплексами (ИК) являются важной составной частью многокомпонентного патологического процесса при аутоиммунных, аллергических, воспалительных и инфекционных заболеваниях. Нами показано (Shepel et al., 2016), что интенсивное воздействие антигенного стимула при иммунизации мышей бычьим сывороточным альбумином (БСА) вызывает в организме системный патологический процесс иммунокомплексного генеза, который сопровождается активацией клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, увеличением уровня ИК в сыворотке крови и усилением их фиксации в поврежденных тканях. При этом выявлено расстройство функций яичников, повреждение морфо-функционального состояния овариальных клеток (Shepel et al., 2016). Известно, что ИК являются сильными активаторами клеток эффекторов, которые вырабатывают большое количество провоспалительных факторов, в том числе и активных форм азота и кислорода (АФК) (Шмагель, Черешнев, 2009; Bosques, Manning, 2016; Mahajan et al., 2016). Нами установлено, что в условиях иммунокомплексной патологии усиливалась генерация АФК, таких как супероксид радикал (Sribna et al., 2016). Чрезмерная активация клеток-эффекторов воспаления, увеличение продукции биологически активных веществ (включая АФК) на фоне недостаточной антиоксидантной защиты клеток является одним из важных патогенетических механизмов повреждения тканей (Jancar, 2005; Шмагель, Черешнев, 2009; Bosques, Manning, 2016; Mahajan et al., 2016), который также может быть задействован в развитие овариальной дисфункции в условиях иммунокомплексной патологии.

Ранее показано, что использование препаратов, проявляющих антиоксидантные свойства, к которым относится “Мексидол” (этилметилгидроксипиридин сукцинат, ГС), оказывает положительный эффект на функциональное состояние миометрия матки мышей на фоне иммунизации БСА (Lytvynenko et al., 2014). Учитывая вышесказанное, является актуальным дальнейшее исследование влияния ГС в условиях системной патологии иммунокомплексного генеза для возможной коррекции овариальной дисфункции, сопровождающейся нарушением оогенеза и, как следствие, ухудшением качества ооцитов. В связи с этим целью нашей работы было: используя модель экспериментального системного иммунокомплексного повреждения, изучить действие ГС на мейотическое созревание ооцитов мышей, оценить целостность генома (степень повреждения ДНК), а также изменение экспрессии генов гремлина 1 (Grem1), гиалуронансинтазы 2 (HAS2) и циклооксигеназы (COX2) в кумулюсных клетках. Согласно современным данным исследуемые гены играют важную роль во время оогенеза и могут характеризовать качество ооцитов (McKenzie et al., 2004; Shepel et al., 2016; Scarica et al., 2019).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на половозрелых самках мышей линии CBA (6–8 недель, массой 18–20 г) вивария Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины. Модель системного хронического патологического процесса иммунокомплексного генеза воспроизводили с помощью иммунизации мышей БСА (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 6 недель внутривенно раз в неделю по схеме: 1-я неделя введения 150 мг БСА/кг; 2-я – 175 мг/кг; 3-я – 200 мг/кг; 4-я – 225 мг/кг; 5-я – 250 мг/кг; 6-я – 275 мг/кг массы мыши. Введение ГС (препарат “Мексидол”, “Фармасофт”, Россия) иммунизированным мышам в дозе 100 мг/кг проводили внутрибрюшинно раз в неделю согласно схемы иммунизации. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. На 7-е сут после последней иммунизации животных подвергали эфирному наркозу и выделяли яичники для дальнейших исследований.

Для оценки мейотического созревания ооцитов из яичников стерильно выделяли зрелые фолликулы и подсчитывали их количество. Кумулюсно-ооцитарные клеточные комплексы культивировали в термостате при 37°C в течение 20 ч в среде ДМЕ с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. После 4 ч культивирования подсчитывали количество ооцитов (в % от общего числа), которые пребывали на стадии метафазы I (растворение зародышевого пузырька), а после 20 ч – на стадии метафазы II (формирование первого полярного тельца).

Степень повреждения ДНК в кумулюсных клетках мышей определяли методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет – “DNA comet assay”) как описано ранее (Shepel et al., 2018). Суть метода заключается в том, что при электрофорезе клеток в агарозном геле петли и фрагменты поврежденной ДНК в электрическом поле вытягиваются по направлению к аноду, что придает им вид комет. Размеры хвоста ДНК-кометы положительно коррелируют со степенью повреждения ДНК (Heaton et al., 2002; Sorochinska, Mikhailenko, 2008; Collins et al., 2014). Электрофорез препаратов (после их стабилизации в течение 20 мин в щелочном электрофоретическом буфере) проводили с помощью прибора Multiphor II (“LKB”, Швеция) при напряжении 24 В и силе тока 100 мА в течение 30 мин. Анализ ДНК-комет на электрофореграммах, окрашенных флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамидин-2 фенилиндол; “Sigma-Aldrich”, США) осуществляли визуально, используя люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ И-1 (Россия) и видеосистему передачи изображения на компьютер при использовании водно-иммерсионного объектива (×85). Применяли полуколичественный метод оценки интенсивности окраски и длины хвостов комет, на каждом микропрепарате анализировали не менее 100 отдельно расположенных ДНК-комет. Их разделяли по общепризнанной классификации на 5 классов с соответствующим числовым значением от 0 до 4, в зависимости от соотношения ДНК в “голове” и “хвосте” кометы (Collins, 2004). Степень повреждения ДНК при этом определяли как индекс “ДНК-комет” ($I_{дк}$), который вычисляли по формуле: $I_{дк} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)/\Sigma$, где n_0–n_4 – число ДНК-комет каждого типа, Σ – сумма подсчитанных ДНК-комет (Sorochinska, Mikhailenko, 2008).

Определение экспрессии мРНК проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Тотальную мРНК получали из кумулюсных клеток с помощью набора Trizol RNA-prep (“Isogen”, Россия). Для обратной транскрипции использовали FirstStrand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва). Полученную одноцепочечную кодирующую ДНК кумулюсных клеток использовали для проведения ПЦР с применением специфических праймеров (табл. 1). ПЦР проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR Systems 2700 (“Applied Biosystems”, США). Полученные ПЦР-продукты затем были оценены с помощью электрофореза в 2.5% агарозном геле, содержащем этидиум бромид. Визуализация и оценка яркости были выполнены с

Таблица 1. Список праймеров, использованных для проведения ПЦР, и размер амплификата

Ген	Последовательность праймеров (прямой, обратный)	Размер амплификата, bp
Grem1	Прямой 5'-AAGGCACTTCCTGTTACTCTGC-3' Обратный 5'-TACGACTGAGATGTCAGGGAGA-3'	256
HAS2	Прямой 5'-CCTCCAGTTAGTGTCTGGGTTC-3' Обратный 5'-CTGTGCAGCTATTCCTGTGTTC-3'	409
COX2	Прямой 5'-GAAGGAACTCAGCACTGCATC-3' Обратный 5'-CAGTCCGGGTACAGTCACACT-3'	213
GAPDH	Прямой 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAATATGA-3' Обратный 5'-AGCACCAGTGGATGCAGGGATGAT-3'	240

применением трансиллюминатора и программного обеспечения ViTran (“Биоком”, Россия).

Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). После проверки распределения полученных результатов на нормальность по тесту Колмогорова–Смирнова осуществляли однофакторный дисперсионный анализ трех групп данных (не менее 6 мышей в каждой), используя one-way ANOVA тест с дальнейшим множественным сравнением с помощью критерия Ньюмена Кейлса. Результаты выражали как $M \pm m$ (среднее ± стандартная ошибка). Отличия считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами показано, что иммунизация мышей БСА вызывала повреждение оогенеза (Shepel et al., 2016). Наблюдалось уменьшение процента ооцитов возобновивших мейоз (метафаза I) и сформировавших первое полярное тельце (метафаза II). Введение ГС на фоне иммунизации БСА положительно влияло на мейотическое созревание ооцитов (рис. 1). Количество клеток на стадии метафазы I увеличивалось от 72.0 ± 2.5% (иммунизация БСА) до 82.7 ± 1.6% (введение ГС) по сравнению с 86.9 ± 3.2% в контроле. Процент ооцитов на стадии метафазы II возрастал от 31.9 ± ± 2.6% (в группе животных с БСА) до 47.0 ± 3.8% (при действии ГС) по сравнению с 49.2 ± 3.9% в контроле.

Хорошо известно, что развитие ооцитов тесно связано с функциональным состоянием их фолликулярного окружения, поэтому мы исследовали целостность ДНК в кумулюсных клетках яичников мышей, иммунизированных БСА, а также животных, у которых иммунизация сопровождалась введением ГС. Согласно данным метода ДНК-комет в кумулюсных клетках фолликулов увеличивалась степень повреждения ДНК. Введение чужеродного белка приводило к увеличению количества разрывов молекулы ДНК, формирующих в электрическом поле “хвост кометы”. Большинство комет относилась к 4-му классу, который характеризует максимальное повреждение ДНК. При этом цитотоксический индекс ($I_{\text{дк}}$ – общепринятый интегральный показатель, учитывающий изменения количества всех типов комет с разной интенсивностью свечения, то есть степенью повреждения ДНК) увеличивался в 4.8 раз, что свидетельствует о развитии сильного генотоксического стресса. Введение ГС иммунизированным мышам значительно снижало генотоксический стресс, способствуя уменьшению количества фолликулярных клеток с высоким уровнем повреждения ДНК (от 55.9 ± 1.2% в группе БСА до 21.4 ± 1.4% при введении ГС, в контроле было 5.4 ± 1.4%; $p < 0.001$), что подтверждалось снижением $I_{\text{дк}}$ в 1.75 раз (рис. 2).

Как показано в предыдущих исследованиях (Shepel et al., 2016), введение мышам БСА приводило к снижению в кумулюсных клетках экспрессии генов Grem1, HAS2 и COX2. По сравнению с

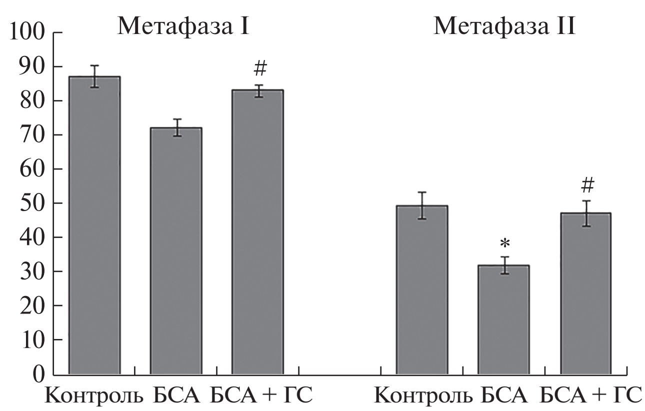

Рис. 1. Мейотическое созревание ооцитов, выделенных из яичников: 1) контрольных мышей; 2) мышей, иммунизированных БСА и 3) при введении ГС иммунизированным животным. По оси ординат – количество ооцитов на стадии метафазы I и II (в % от общего количества культивированных ооцитов). * – $p < 0.05$ по отношению к контролю; # – $p < 0.05$ по отношению к иммунизации БСА.

(а)

(б)

(в)

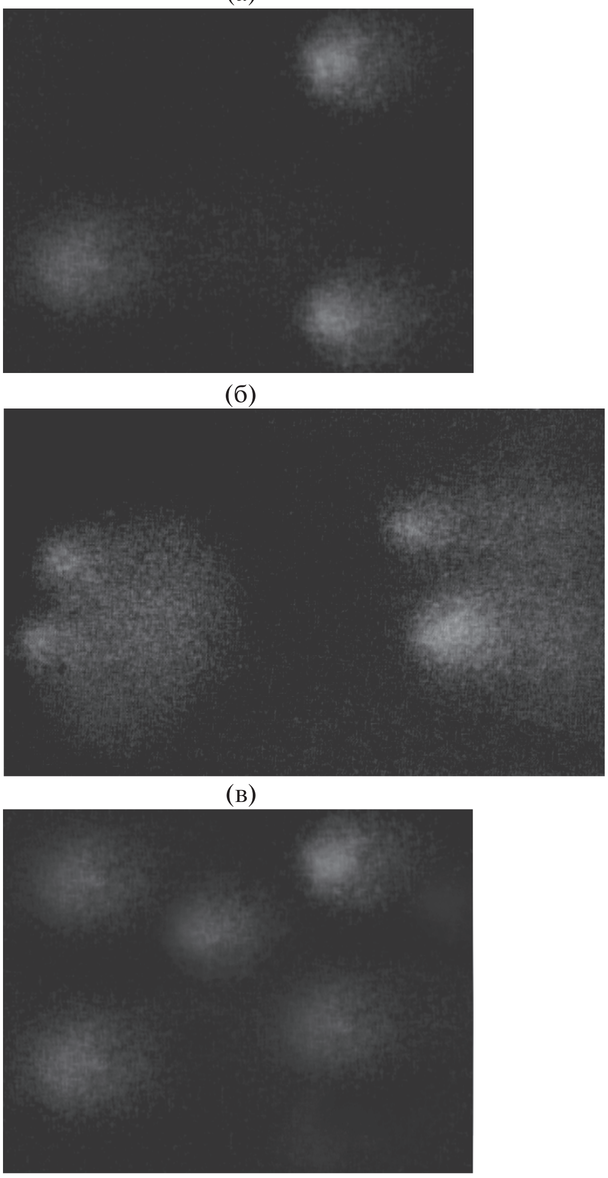

Рис. 2. Микрофотографии ДНК-комет, выполненные с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ И-1 (Россия) и видеосистемы передачи изображения на компьютер при использовании водно-иммерсионного объектива (×85). Окрашивание красителем DAPI. (а) контроль: кумулюсные клетки мышей с неповрежденной ДНК (классы 0–1). (б) введение БСА: клетки с сильным повреждением ДНК (классы 3–4). (в) введение ГС животным, иммунизированным БСА (ДНК-кометы класса 0–1).

контрольными животными количество мРНК HAS2 у иммунизированных было уменьшено в 2.21 раз, COX2 – в 1.76 и Grem1 – в 1.41 раз. В данной работе установлено, что после введения ГС наблюдалось увеличение уровня мРНК COX2 – в 1.61 раз и Grem1 – в 1.47 раз (рис. 3, 4). Отмечено также усиление экспрессии мРНК HAS2 в

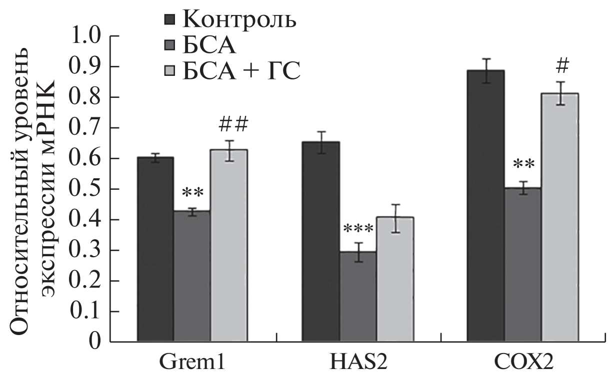

Рис. 3. Экспрессия генов Grem1, HAS2 и COX2 в кумулюсных клетках: 1) контрольных мышей; 2) мышей, иммунизированных БСА и 3) при введении ГС иммунизированным животным. ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по отношению к контролю; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ по отношению к иммунизации БСА.

1.38 раза, однако эти значения не были статистически достоверными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что иммунизация БСА вызывала повреждение оогенеза, о чем свидетельствовало уменьшение количества ооцитов, достигающих стадии метафазы I и II. Одной из причин угнетения мейотического созревания являлось нарушение морфо-функционального состояния фолликулярного аппарата, которое характеризовалось значительным повреждением ДНК кумулюсных клеток, развитием в них сильного генотоксического стресса. Как известно, сильное повреждение ДНК приводит к гибели клеток, включая некроз, который, в свою очередь, может усиливать воспалительный ответ и повреждение органа. Кроме того, под влиянием БСА (Shepel et al., 2016) происходило значительное снижение уровней мРНК Grem1, HAS2 и COX2. Исследуемые гены играют критически важную роль в фолликуло- и оогенезе, в частности, участвуют в механизме формирования внеклеточного матрикса, необходимого для процесса кумулюсного расширения, и, таким образом, способствуют созреванию ооцита (McKenzie et al., 2004; Assou et al., 2010). Известно, что HAS2 представляет собой фермент, ответственный за синтез гиалуроновой кислоты, которая является главной структурной основой кумулюсного внеклеточного матрикса (Assou et al., 2010). COX2 способствует кумулюсному расширению через индукцию продукции простагландина E2 (PGE2). Мыши, лишенные функциональной COX2, имеют дефекты в овуляции, оплодотворении, имплантации и децидуализации (McKenzie et al., 2004). GREM1 селективно ингибирует сигнализацию костного морфогенетического белка 15 (BMP 15) и

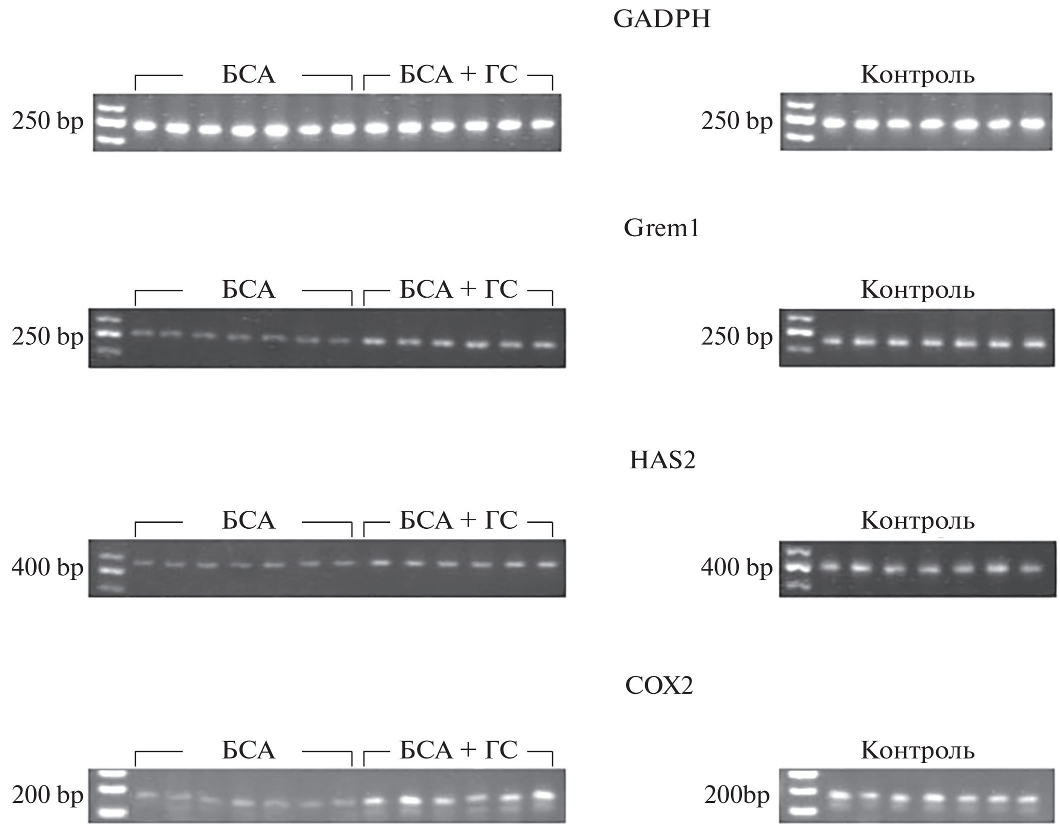

Рис. 4. Фореграмма результатов амплификации генов GADPH, Grem1, HAS2, COX2 в кумулюсных клетках при введении ГС мышам, иммунизированным БСА.

предотвращает преждевременную лютеинизацию муральных гранулярных клеток, способствуя кумулюсному расширению (Pangas et al., 2004). Кроме того, экспрессия исследуемых генов находится под контролем паракринного ростового фактора дифференцировки 9 (GDF9), который секретируется ооцитом и играет многофункциональную роль в коммуникациях между клетками гранулезы и ооцитами (Kim et al., 2019), в регуляции дифференцировки и функции фолликулярных клеток. Таким образом, уровень транскриптов данных генов-мишеней GDF9 в кумулюсных клетках может отражать активность GDF9 и, как итог, прогнозировать состояние ооцита (McKenzie et al., 2004).

Используемый в данной работе ГС оказывал протективное влияние на клетки фолликулярного окружения ооцитов иммунизированных мышей. Введение ГС значительно снижало степень повреждения ДНК кумулюсных клеток, на что указывало уменьшение $I_{дк}$ и количества клеток с сильно поврежденной ДНК. Анализ уровня экспрессии генов показал увеличение количества мРНК HAS2, COX2 и Grem1 в клетках кумулюса. Подобные изменения сопровождались улучшением мейотического созревания ооцитов, как на стадии метафазы I, так и метафазы II.

Положительный эффект ГС на морфо-функциональное состояние клеток яичников мышей может быть связан с его стимулирующим влиянием на энергосинтезирующую функцию митохондрий. Согласно литературным данным существует положительная корреляция между уровнем АТФ в клетках кумулюса и числом ооцитов, достигших метафазы II (Hsu et al., 2015). Наличие такой корреляции позволяет предположить, что уровень АТФ в кумулюсных клетках может быть индикатором общего состояния здоровья связанных с ними ооцитов. В исследованиях с использованием фармакологических ингибиторов показано влияние соответствующего уровня метаболизма жирных кислот и АТФ в клетках кумулюса на качество ооцита и последующее развитие здорового эмбриона. Липидный обмен обеспечивает мощный источник энергии, и его важность во время созревания ооцитов становится все более очевидной (Dunning et al., 2014).

Протективный эффект ГС может быть также обусловлен его антиоксидантным и мембраностабилизирующим действиями. БСА вызывает активацию клеток врожденного иммунитета, продукцию ими провоспалительных цитокинов, а также реактивных молекул, которые ведут к развитию оксидативного стресса, нарушению биологических свойств мембран, повреждению ДНК и клеточной функции. ГС ингибирует свободнорадикальные процессы, активированные в условиях иммунокомплексной патологии, нормализуя, таким образом, баланс между продукцией свободных радикалов и системой их обезвреживания. Однако для подтверждения данных предположений необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГС в использованной нами схеме и дозе введения оказывает значительный протективный эффект на морфо-функциональное состояние овариальных клеток и является перспективным для терапевтического использования при иммунокомплексных заболеваниях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование было поддержано Национальной Академией Наук Украины.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении экспериментальных работ были соблюдены международные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных Совета Европы (Страсбург, 1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.А. Кондрацкая, Н.Г. Грушка и Т.Ю. Вознесенская: дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, поиск литературы, составление рукописи; Р.И. Янчий: дизайн исследования, интерпретация полученных данных, критические комментарии к рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Шмагель К.В., Черешнев В.А. Молекулярные основы иммунокомплексной патологии // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 581–592.

Assou S., Haouzi D., De Vos J. et al. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes // Mol. Hum. Reprod. 2010. V. 16. № 8. P. 531–538. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq032

Bosques C.J., Manning A.M. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs // Autoimmun. Rev. 2016. pii: S1568-9972(16)30180-X. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.035

Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. № 3. P. 249–261.

Collins A.R., El Yamani N., Lorenzo Y. et al. Controlling variation in the comet assay // Front. Genet. 2014. № 5. P. 359. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359

Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β-oxidation // Reproduction. 2014. V. 148. № 1. P. R15–R27. https://doi.org/10.1530/REP-13-0251

Heaton P.R., Ransley R., Charlton C.J. et al. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes // J. Nutr. 2002. V. 132 (6). Suppl. 2. P. 1598–1603. https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1598S

Hsu A.L., Townsend P.M., Oehninger S. et al. Endometriosis may be associated with mitochondrial dysfunction in cumulus cells from subjects undergoing *in vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection, as reflected by decreased adenosine triphosphate production // Fertil. Steril. 2015. V. 103. № 2. P. 347–352.e1. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.002

Jancar S., Crespo M.S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm // Trends Immunol. 2005. V. 26. № 1. P. 48–55.

Kim W.J., Lee S.E., Park Y.G. et al. Antioxidant hesperetin improves the quality of porcine oocytes during aging in vitro // Mol. Reprod. Dev. 2019. V. 86. № 1. P. 32–41. https://doi.org/10.1002/mrd.23079

Lytvynenko A.P., Shepel O.A., Kaleinikova O.M. “Mexidol” effects on myometrium contractility in mice uterus cervical parts // Achiev. Biol. Med. 2014. № 1(23). P. 21–24.

Mahajan A., Herrmann M., Muñoz L.E. Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE // Front. Immunol. 2016. V. 7. P. 35. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00035

McKenzie L.J., Pangas S.A., Carson S.A. et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF // Hum. Reprod. 2004. V. 19. № 12. P. 2869–2874.

Pangas S.A., Jorgez C.J., Matzuk M.M. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 31. P. 32281–32286.

Pavlovych S.I., Lytvynenko A.P., Makogon N.V. et al. Immunomorphological characterization of mouse model of a systemic immune complexes mediated pathology // Rep. Morph. 2014. V. 8. № 2. P. 496–500.

Scarica C., Cimadomo D., Dovere L. et al. An integrated investigation of oocyte developmental competence: expression of key genes in human cumulus cells, morphokinetics of early divisions, blastulation, and euploidy // J. Assist. Reprod. Genet. 2019. V. 36. № 5. P. 875–887. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01410-3

Shepel E., Grushka N., Makogon N. et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) protects against experimental immune complex-induced ovarian failure in mice // Int. J. Health Sci. Res. 2016. V. 6. № 11. P. 103–108.

Shepel E., Grushka N., Makogon N. et al. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice // Pharmacol. Rep. 2018. V. 70. № 6. P. 1146–1149. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.06.005

Shepel E.A., Voznesenskaya T.Y., Blashkiv T.V., Yanchii R.I. Cumulus cell genes as potential biomarkers of oocyte and embryo developmental competence // Fiziol. Zh. 2016. V. 62. № 1. P. 107–113.

Sorochinska J., Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different inveronmental agents // Oncology. 2008. V. 10. № 3. P. 303–308.

Sribna V.O., Grushka N.G., Martynova T.V. et al. Functional activity of innate immunity cells under poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in conditions of experimental immune complex-mediated pathology // Exp. Clin. Med. 2016. V. 2. № 71. P. 189–193.

The Effect of Ethylmethylhydroxypyridine Succinate ("Mexidol") on Oocyte Meiotic Maturation, Genome Integrity, as Well as the Change in Gene Expression in Mouse Cumulus Cells under the Conditions of Systemic Immune Complex Damage

E. A. Kondratskaya[1,] *, N. G. Grushka[1], T. Yu. Voznesenskaya[1], and R. I. Yanchii[1]

[1]Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Bogomoletz ul. 4, Kyiv, 01024 Ukraine

**e-mail: elena-shepel@ukr.net*

Using a model of experimental systemic immune complex damage (induced by long-term immunization of CBA mice with bovine serum albumin (BSA)), we studied the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate (HS, "Mexidol") on oocyte meiotic maturation, the degree of DNA damage to follicular cells, as well as gene expression of gremlin 1 (Grem1), hyaluronan synthase 2 (HAS2) and cyclooxygenase 2 (COX2) in cumulus cells. According to modern data these genes play a critical role in oogenesis and can characterize oocyte quality. HS administration had a protective effect on the morphological and functional state of ovarian cells. The introduction of HS weakened the genotoxic stress induced by BSA, which was manifested in a decrease in the number of cumulus cells with severe DNA damage. The study revealed gene expression changes: the number of COX2 mRNA was increased 1.61-fold and Grem1 mRNA – 1.47-fold. An increase in the content of HAS2 gene transcripts was also detected – 1.38-fold; however, this value was not statistically significant. These changes had a positive effect on the meiotic maturation of oocytes: there was a significant increase in their number at metaphase I and II stages. We believe that HS can be used for therapeutic purposes in immune complex diseases.

Keywords: BSA immunization, oocyte meiotic maturation, genome integrity, gene expression, cumulus cells

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 225–234

МОРФОГЕНЕЗ

УДК 611.81.013

МИКРОГЛИЯ И ТАНИЦИТЫ ОБЛАСТИ ИНФУНДИБУЛЯРНОГО УГЛУБЛЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ СТАРЕНИИ

© 2020 г. Д. А. Суфиева[a], *, В. А. Разенкова[a], М. В. Антипова[a, b], Д. Э. Коржевский[a]

[a]*ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия*

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

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

Поступила в редакцию 18.01.2020 г.
После доработки 09.02.2020 г.
Принята к публикации 12.02.2020 г.

Цель работы состояла в изучении структуры и пространственных взаимоотношений микроглии и таницитов в медиабазальном гипоталамусе в раннем постнатальном онтогенезе и при старении. С применением иммуногистохимических методов были исследованы срезы головного мозга крыс линии Вистар на следующих сроках: постнатальные 7, 14 и 30 сутки развития, взрослые (4–5 мес.) и старые (20 мес.) животные (n = 3 для каждого срока). Были выделены различные типы микроглии, которые отличались локализацией в области инфундибулярного углубления, морфо-функциональными признаками, а также пространственными взаимоотношениями с таницитами. Была показана возрастная динамика активности микроглии в изучаемой области. Полученные результаты будут способствовать установлению роли микроглии и таницитов в формировании барьерных структур в медиабазальном углублении и возрастных особенностей центральной нейроиммуноэндокринной регуляции.

Ключевые слова: микроглия, таниципы, инфундибулярное углубление, медиабазальный гипоталамус, развитие, старение, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S047514502003009X

ВВЕДЕНИЕ

Область инфундибулярного углубления (область воронки гипофиза) располагается в нижней части третьего желудочка мозга (детальную схему строения инфундибулярного углубления см. на рис. 4б). Эта область относится к медиабазальному гипоталамусу и включает в себя вентромедиальное и аркуатное ядра гипоталамуса, а также срединное возвышение, которое является одним из циркумвентрикулярных органов (ЦВО) головного мозга. ЦВО характеризуются наличием капилляров фенестрированного типа (то есть, они лишены гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)) (Schulz, Engelhardt, 2005; Joly et al., 2007). Выстилка области инфундибулярного углубления сформирована таницитами, высокоспециализированными биполярными клетками с длинным базальным отростком. Эти клетки оплетают концами своих отростков кровеносные сосуды подлежащей нервной ткани, в том числе фенестрированные капилляры портальной системы гипофиза в срединном возвышении. Они могут транспортировать различные молекулы из крови к нейронам ядер гипоталамуса, а также регулируют высвобождение рилизинг-факторов нейросекреторными клетками гипоталамуса в кровеносное русло. Таким образом, танициты являются одними из ключевых игроков в регуляторной нейроэндокринной системе медиабазального гипоталамуса (Gao et al., 2014; Prevot et al., 2018; Rodriguez et al., 2019). Сегодня в литературных источниках появляется все больше данных о роли микроглии наряду с таницитами в регулировании энергетического баланса в организме (Bobbo et al., 2019). Клетки микроглии представляют собой резидентные макрофаги ЦНС и формируют собственную иммунную систему головного и спинного мозга. Микроглиоциты выполняют ряд важных функций: в ответ на инфекцию или повреждение микроглия переходит в активированное состояние и начинает секретировать про- или противовоспалительные цитокины, фагоцитирует поврежденные клетки, участвует в ремоделировании синапсов (Lannes et al., 2017). Было показано, что в гипоталамусе их избыточная провоспалительная активация может привести к нарушению обмена веществ в организме, в частности, к ожирению (Valdearcos et al., 2017; Mendes et al., 2018). Микроглия и танициты формируют первую линию защиты в срединном возвышении, в связи с чем изучение пространственных взаимоотношений этих двух клеточных популяций в медиабазальном гипоталамусе представляет особый интерес. Целью данного исследования было изучить структурно-функциональные взаимоотношения между микроглией и таницитами в области инфундибулярного углубления в раннем постнатальном онтогенезе и при старении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужил головной мозг крыс-самцов линии Вистар на различных сроках постнатального онтогенеза: постнатальные 7 (P7), 14 (P14) и 30 (P30) сутки развития, взрослые (4–5 мес.) и старые (20 мес.) животные ($n = 3$ для каждого срока). При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015). Обезвоженные объекты заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм на уровне от –3.24 до –4.44 мм по отношению к брегме (Paxinos, Watson, 2007). Исследовали фронтальные срезы промежуточного мозга на уровне аркуатного ядра гипоталамуса. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезы подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере S1700 (Agilent, США) с последующим блокированием эндогенной пероксидазы. Для выявления клеток микроглии использовали поликлональные кроличьи антитела к Iba-1 (Biocare medical, США) в разведении 1 : 900. В качестве вторичного реагента был использован набор Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3'3-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Полученные препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Для обработки изображений использовали программу LAS EZ (Leica, Германия).

Для изучения пространственной организации таницитов и микроглии была поставлена двойная иммуногистохимическая реакция на белок промежуточных филаментов III типа – виментин, который является маркером таницитов, и Iba-1, который является маркером микроглии. В качестве первичных реагентов использовали моноклональные мышиные антитела к виментину (клон V-9, Agilent, США, в разведении 1 : 100) и поликлональные кроличьи антитела к Iba-1 (Biocare medical, США, в разведении 1 : 500). В качестве вторичных реагентов применяли Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осла, меченный биотином-SP (Jackson ImmunoResearch, США) и моновалетный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX, Jackson ImmunoReaserch, США), а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch, США). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 применяли лазер с длинной волны 488 нм, для RRX – 561 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерных программ Zen-2012 и LSM Image Browser (Zeiss, Германия). Для оценки возрастных изменений в количестве микроглиоцитов во всей изучаемой области инфундибулярного углубления подсчет производился по трем полям зрения (в каждом поле использовалась рамка размером 175 × × 198 мкм) на увеличении ×40 для каждого случая. Количество микроглии определяли на единицу площади (1 мм^2). Данные представлены в виде средней ± ошибки средней. Статистический анализ был произведен в программе Prism GraphPad 8. Применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), с последующим сравнением групп с помощью post-hoc-критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При иммуногистохимическом выявлении Iba-1 было установлено, что на P7 и P14 сутки развития микроглиоциты в инфундибулярном углублении характеризуется округлой формой, короткими и утолщенными отростками, что указывает на активированное состояние этих клеток (рис. 1а). При анализе пространственного взаимоотношения микроглиоцитов с клетками выстилки (таницитами) можно выделить несколько типов микро-

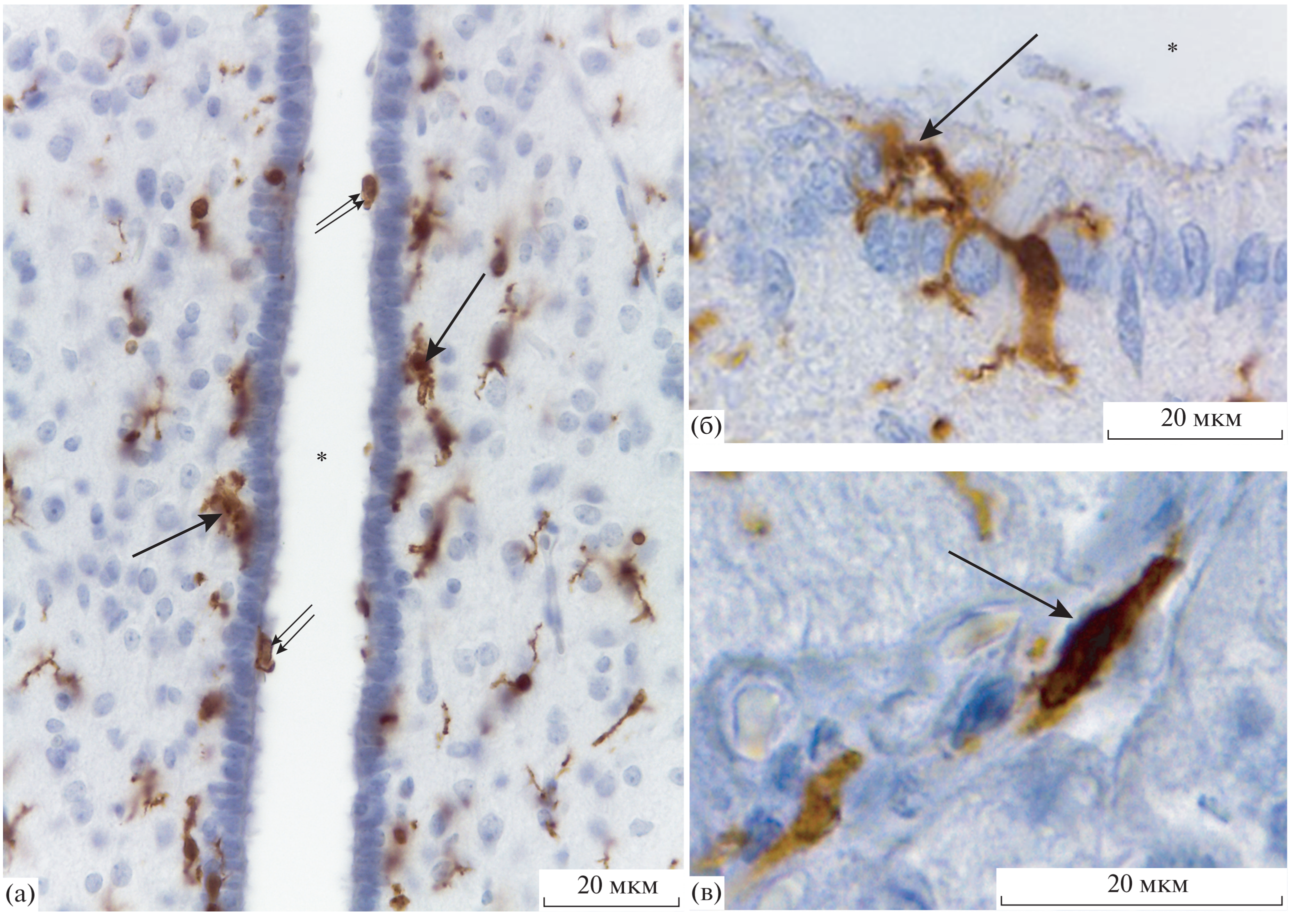

Рис. 1. Инфундибулярное углубление дна третьего желудочка. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1, подкраска ядер квасцовым гематоксилином. а – 7 сутки постнатального развития, область α1 таницитов. б – старое животное, субэпендимная микроглия, контактирующая с СМЖ; в – взрослое животное, периваскулярные микроглиоциты в срединном возвышении. Стрелка указывает на субэпедимные (а, б) и периваскулярные (в) микроглиоциты, двойная стрелка – супраэпендимные микроглиоциты.

глии в зависимости от их локализации, которые отличаются по ряду морфологических признаков. Непосредственно под телами клеток, которые формируют выстилку инфундибулярного углубления, локализуются субэпендимные микроглиоциты (рис. 1а, 1б). Это веретеновидные, как правило, биполярные клетки. Главные их отростки отходят от разных полюсов клетки и направлены вдоль эпендимного пласта, которые затем могут ветвиться на отростки более мелкого порядка. Некоторые из них проникают через эпендимный пласт и контактируют с СМЖ (рис. 1б). В области перехода эпендимоцитов в таницины выстилка формирует двурядную структуру, и когда таницины полностью замещают эпендимоциты, выстилка снова становится однорядной. Интересно, что в области перехода микроглиоциты всегда локализуются между двумя рядами клеток выстилок и морфологически напоминают субэпендимные микроглиоциты (рис. 2а). Помимо субэпендимных микроглиоцитов встречаются и супраэпендимные макрофаги, которые локализуются непосредственно в полости желудочка на апикальной поверхности клеток выстилки (рис. 1а). Эти клетки имеют округлую или овальную форму и не имеют отростков. Иногда встречаются клетки веретеновидной формы с двумя полярно отходящими неветвящимися отростками. В нервной ткани микроглия на этих сроках развития характеризуется переходным состоянием между амебоидной и рамифицированной (отростчатой) формами. Это клетки с округлой сомой и короткими утолщенными слабоветвящимися отростками (рис. 1а). В срединном возвышении локализуются амебоидные микроглиоциты – клетки с округлой сомой либо без отростков, либо с очень короткими неветвящимися отростками. Рядом с фенестрированными сосудами наблюдаются микроглиоциты с округлой сомой, отростки которых находятся в тесном контакте с кровеносными сосудами.

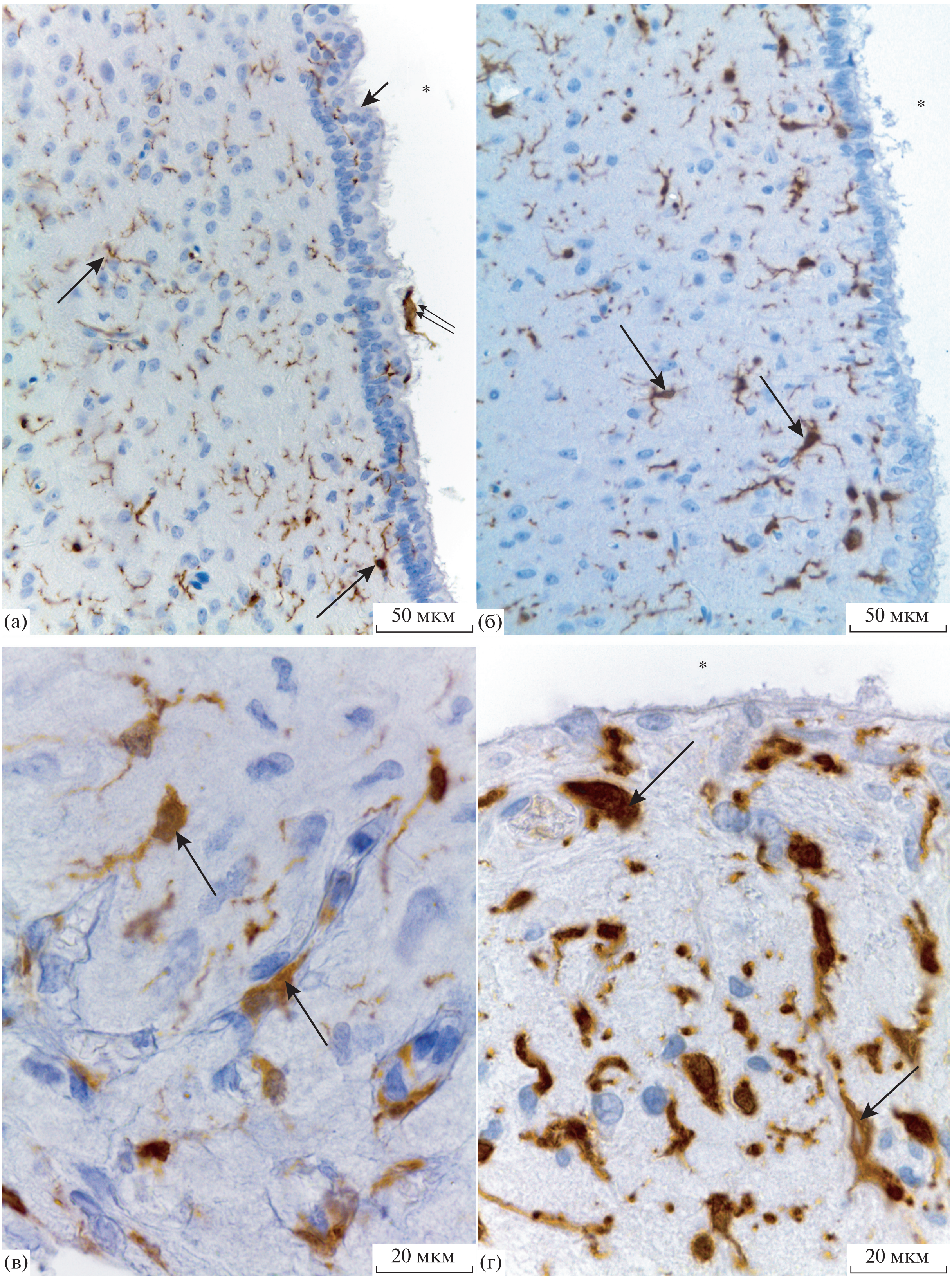

Рис. 2. Микроглия дна третьего желудочка. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1, подкраска квасцовым гематоксилином. а – 30 сутки постнатального развития, область $\alpha1$ таницитов; б – старое животное, область аркуатного ядра гипоталамуса; в – взрослое животное, zona externa срединного возвышения; г – старое животное, zona interna срединного возвышения. Стрелка указывает на микроглию, двойная стрелка – супраэпендимная микроглия, головка стрелки – переходная зона, звездочка – полость третьего желудочка.

На 30 сутки постнатального развития в инфундибулярном углублении микроглия представлена рамифицированной формой. Они характеризуются небольшой сомой и длинными тонкими ветвящимися отростками, однако встречаются отдельные микроглиоциты переходной формы (рис. 2а). Для P30 суток развития характерно присутствие субэпендимной микроглии, но их число значительно меньше по сравнению с более ранними сроками развития. Кроме того, наблюдались единичные супраэпендимные макрофаги (рис. 2а). В области срединного возвышения микроглия, также как и у молодых животных, была представлена амебоидным, либо реже переходным типами. Также отчетливо можно выделить еще один тип микроглии – типичные периваскулярные микроглиоциты, которые располагались вдоль фенестрированных капилляров портальной системы гипофиза (zona externa). Это мелкие клетки, распластанные вдоль базальной мембраны сосуда. Они, как правило, не имеют отростков (рис. 1в).

Для взрослых интактных животных характерна отростчатая микроглия, которая диффузно распределена в нервной ткани. Вдоль эпендимного пласта супраэпендимные макрофаги у взрослых животных не наблюдалась, встречались лишь единичные субэпендимные микроглиоциты. В срединном возвышении микроглия представлена активными формами – амебоидной и переходной формами, и периваскулярными микроглиоцитами в zona externa (рис. 2в).

У старых крыс в нервной ткани наблюдалась активированная микроглия – амебоидного и переходного типов (рис. 2б). Присутствовали все типы микроглии описанные для молодых животных, а именно, субэпендимная микроглия (рис. 1б) и супраэпендимные макрофаги. В срединном возвышении локализовалась амебоидная микроглия и периваскулярные микроглиоциты, при этом микроглиоциты переходной формы практически отсутствовали (рис. 2г).

Количество клеток микроглии в области инфундибулярного углубления изменялось в процессе постнатального развития и при старении. Число клеток нарастало и достигало своего максимума на 14-й день постнатального онтогенеза. В дальнейшем их количество уменьшалось и снова увеличивалось (почти в 4 раза) при старении (рис. 3). При подсчете количества супраэпендимных и субэпендимных микроглиоцитов в инфундибулярном углублении было установлено, что число супраэпендимных макрофагов максимально на P7 и P14 сутки развития ($p < 0.01$). С развитием это число снижалось, и у одномесячных и

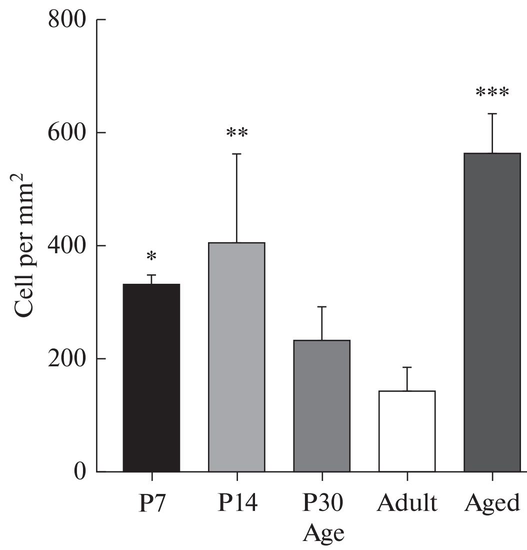

Рис. 3. Динамика изменения числа микроглиоцитов области инфундибулярного углубления в ходе постнатального онтогенеза и при старении. P7, P14, P30 – 7, 14, 30 сутки постнатального развития соответственно; Adult – взрослое животное (4–6 месяцев), Aged – старые животные (20 мес.). P-value: * – <0.05; ** – <0.01; *** – <0.001.

старых крыс встречались лишь единичные супраэпендимные макрофаги, в то время как у взрослых интактных крыс этот тип клеток в исследуемой области отсутствовал. В процессе онтогенеза также изменялось и число субэпендимных микроглиоцитов. Было установлено, что популяция субэпендимной микроглии максимальна на 7 сутки постнатального развития и у старых крыс (15 ± 4.2 и 14 ± 0.0 соответственно). На других исследованных сроках среднее число субэпендимных микроглиоцитов варьировало в пределах от 5 ± 1.2 на P14 сутки до 5.8 ± 2 у 30-дневных и взрослых животных. Однако при проведении однофакторного дисперсионного анализа статистически значимых различий между исследованными группами не обнаружилось.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений в изучении ЦНС является исследования клеток микроглии, их пространственных взаимоотношений с другими клетками нервной ткани, клеточных сигнальных путей, задействованных в иммунном ответе, функциональной роли в норме и при патологии. Микроглия происходит из эритромиелодных предшественников желточного мешка, заселяя мозг в раннем эмбриогенезе (на E10–12 день у крыс) еще до формирования гематоэнцефалического барьера, и представляют собой

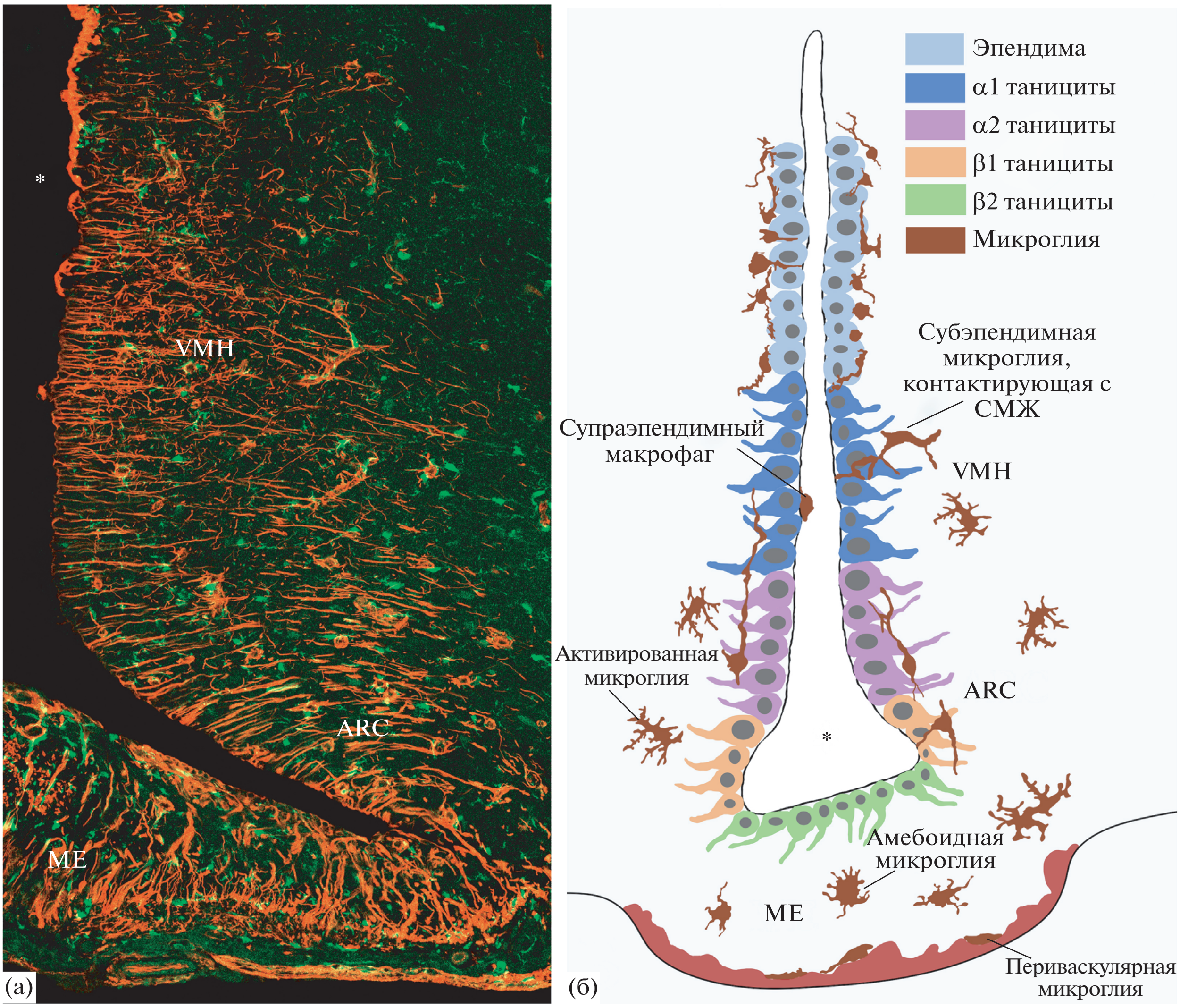

Рис. 4. Различные типы микроглии в инфундибулярном углублении. (а) – двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (маркер таницитов, красный цвет) и Iba-1 (маркер микроглии, зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия, единичный оптический срез. (б) – схема различных типов микроглии в инфундибулярном углублении. ME – срединное возвышение; ARC – аркуатное ядро, VMH – вентромедиальное ядро гипоталамуса. Звездочка – полость третьего желудочка.

самоподдерживающуюся и долгоживущую клеточную популяцию. В ответ на различные повреждающие факторы микроглиоциты переходят из рамифицированной (или покоящейся) в амебоидную (активированную) форму (Alekseeva et al., 2019). В последнее время помимо изучения роли микроглии как медиатора воспаления и одного из ключевых игроков при повреждении и нейродегенерации, все больше исследований посвящены изучению микроглии в норме. Сегодня среди исследователей не вызывает сомнения, что микроглия не является единообразной популяцией клеток, а представлена разными ее подтипами в различных структурах головного мозга, а также на разных этапах онтогенеза (Stratoulias et al., 2019; Tan et al., 2019).

В настоящем исследовании при изучении микроглии в ходе постнатального онтогенеза и при старении нами также были определены различные типы микроглии, которые отличались локализацией в области инфундибулярного углубления и пространственными взаимоотношениями с таницитами, а также морфологическими и функциональными признаками (рис. 4).

Было установлено, что в первые две недели развития микроглия в этой области активирована, а число этих клеток возрастает. После активность и количество микроглиоцитов идет на спад, и к первому месяцу постнатального развития микроглия характеризуется, как и у взрослых, отростчатой формой. Полученные результаты согласуются и дополняют литературные данные, где было показано, что у крыс число микроглиоцитов возрастает в течение эмбриогенеза и первых двух недель постнатального развития, и клетки переходят из активированной формы в рамифицированную (Lenz, Nelson, 2018). Высокую активность микроглии в этот период связывают с одной из важных функций микроглии, а именно в созревании и ремоделировании синапсов, а также элиминации ненужных синаптических связей. Микроглия может регулировать количество нейронов в развивающемся головном мозге путем фагоцитоза мертвых или умирающих клеток и обеспечивать трофическую поддержку нервных клеток-предшественников для их пролиферации и созревания. Было также предложено, что микроглиальные клетки в развивающейся ЦНС регулируют васкуляризацию и влияют на миелинизацию (Kaur et al., 2017; Lenz, Nelson, 2018).

Наше исследование показало, что у взрослых животных помимо типичных отростчатых микроглиоцитов, локализовавшихся в нервной ткани в области аркуатного и вентромедиального ядер гипоталамуса, была выделена популяция субэпендимных микроглиоцитов (Кирик и др., 2014), которые локализовались непосредственно под телами таницитов. Их отростки были всегда направлены вдоль выстилки, а у некоторых из этих клеток отростки проникали через эпендимный пласт и контактировали с СМЖ. Такой тесный контакт микроглии с СМЖ может указывать на контроль этими клетками состава СМЖ и на возможность секреции активных молекул (цитокинов) в СМЖ для паракринной регуляции функциональной активности таницитов. Так было установлено, что на таницитах (в основном β таницитах) присутствуют рецепторы интерлейкина-6α (IL-6Rα). Было показано, что интрацеребровентрикулярное введение IL-6 посредством связывания с IL-6Rα, расположенном на телах таницитов, задействовано в регуляции метаболических процессов, усиливая расход энергии и термогенез (Anesten et al., 2017). Следовательно, микроглия, синтезируя цитокины (например, IL-6) в СМЖ, опосредовано через таницыты может быть задействована в регуляции энергетического гомеостаза организма.

В отдельный тип стоит выделить микроглию срединного возвышения. В данной работе было установлено, что на всех исследованных сроках микроглия в срединном возвышении чрезвычайно активна. На сегодняшний день в литературе существуют единичные данные о распределении и функциональном статусе микроглии в данной области, а микроглия срединного возвышения в возрастном аспекте ранее не изучалась. Нами было показано, что у взрослых животных в срединном возвышении микроглия активирована, несмотря на отсутствие патологии. Полученные данные согласуются с исследованием Takagi et al. (Takagi et al., 2019). Авторы показали, что микроглия у контрольных животных в ЦВО характеризовалась амебоидной формой и находилась в тесном контакте с фенестрированными капиллярами. Кроме того, экспрессия маркеров характерных как для M1 (CD16/32 и CD86), так и для M2 (CD206 и Ym1) типов в микроглии ЦВО была значительно выше, чем в других областях мозга. Авторы предполагают, что амебоидная микроглия в этих органах вовлечена в регуляцию проницаемости кровеносных сосудов и/или ангиогенеза. Кроме того, активированное состояние микроглии может указывать на фагоцитоз этими клетками нейротоксичных молекул или клеток, которые поступают с кровотоком. Таким образом, микроглия задействована в поддержании гомеостаза нервной ткани (Takagi et al., 2019). В другой работе с помощью метода электронной микроскопии было установлено, что в срединном возвышении у контрольных животных микроглия характеризуется фенотипом, который авторы назвали “темная микроглия” (“dark microglia”). Такое название обусловлено тем, что на ультраструктурном уровне эти клетки выглядят темными за счет конденсации в них цитоплазмы, а также характеризуются признаками окислительного стресса. Было показано, что этот тип микроглии характеризуется высокой активностью и в других областях мозга характерен для патологических состояний, таких как хронический стресс, старение, болезнь Альцгеймера. Это указывает на высокую активность микроглиоцитов в области срединного возвышения, несмотря на отсутствие патологического состояния (Bisht et al., 2016). Таким образом, нами впервые была изучена микроглия срединного возвышения в постнатальном онтогенезе и при старении, и было установлено, что на всех исследованных сроках микроглия в этой области характеризуется амебоидным типом и находится в тесном контакте с фенестрированными капиллярами, и, вероятно, является чрезвычайно активированной на протяжении всего постнатального онтогенеза.

Мы показали, что на определенных этапах онтогенеза, а именно в первый месяц постнатального развития и у старых животных, в области инфундибулярного углубления встречались супраэпендимные макрофаги. Ранее супраэпендимные клетки дна третьего желудочка были описаны с использованием метода электронной микроскопии у мышей (Bleier, 1977) и крыс (Mestres, Breipohl, 1976; Mestres, 1976). Было показано, что эти клетки локализуются в инфундибулярном углублении на апикальной поверхности клеток выстилки, лишенных ресничек – таницитах, и их число варьирует в зависимости от фазы эструса у самок, в то время как у самцов это число остается постоянным. Авторы предполагают, что эти клетки обладают фагоцитарной активностью, то есть являются макрофагами, и выполняют те же функции, что и клетки Колмера в сосудистом сплетении, а именно утилизируют клеточный дебрис, нейротоксичные вещества и патогенны СМЖ, являясь важными компонентами ликворо-энцефалического барьера (Lu et al., 1993). Кроме того, вероятно, эти клетки могут фагоцитировать фрагменты цитоплазмы эпендимных клеток, в которых накапливаются поврежденные органеллы. Увеличение или уменьшение числа супраэпендимных макрофагов у самок авторы связывают с возможной ролью этих клеток в регулировании на поверхности эпендимных клеток числа и размеров микроворсинок, которые, как показали авторы, различаются у самок в разные фазы эструса (Bleier, 1977). В настоящем исследовании нами не были обнаружены супраэпендимные макрофаги у взрослых животных. Возможно, что-либо у самцов эти клетки являются единичными и при исследовании не попали на изучаемые срезы, либо у взрослых крыс эти клетки являются Iba-1 иммунонегативными. Тем не менее, супраэпендимные макрофаги встречались у молодых и старых животных. Вероятно, увеличенное количество этих клеток в полости желудочка указывает на высокую активность этих клеток на данных этапах онтогенеза, что необходимо для активного удаления лишних клеточных элементов из СМЖ.

В данном исследовании было показано, что в ходе нормального старения в области инфундибулярного углубления число микроглиоцитов резко возрастает по сравнению со взрослыми животными и переходит в амебоидной тип, что указывает на чрезвычайно активное состояние этих клеток. Установлено, что старение в ЦНС характеризуется высоким уровнем окислительного стресса и перекисного окисления липидов. Предполагается, что накопление с возрастом свободных радикалов приводит к развитию нейровоспаления (Norden, Godbout, 2013). Было также показано, что с возрастом происходит нарушение проницаемости гематоэнцефалического и ликвороэнцефалического барьеров (Erickson, Banks, 2019), а в таницитах, формирующих барьерные структуры, происходит дезорганизация отростков, что приводит к невозможности нормального функционирования этих клеток (Koopman et al., 2017; Суфиева и др., 2019). Кроме того, с возрастом уменьшается уровень половых гормонов и IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) (в транспорт которых также вовлечены танициты), которые в гипоталамусе активируют нейропротекторные и противовоспалительные сигнальные пути, в частности, подавляя NFκB-сигнальный путь. Падение уровня этих гормонов и ростовых факторов способствует развитию системного нейровоспаления и дисфункции медиабазального гипоталамуса. Это, в частности, отражается в развитии диабета 2-го типа, гипергликемии, инсулинорезистетности, сердечно-сосудистых заболеваний (Chowen, Garcia-Segura, 2019).

Таким образом, в ходе настоящего исследования была показана возрастная динамика активности микроглиоцитов, впервые были определены разные их типы в области инфундибулярного углубления на разных этапах постнатального онтогенеза, были проанализированы пространственные и функциональные взаимоотношения микроглии и таницитов. Полученные данные будут способствовать дальнейшему пониманию роли этих клеток в формировании и возрастной динамике состояния барьерных структур инфундибулярного углубления и возрастных особенностей центральной нейроиммуноэндокринной регуляции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-315-00134).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.А. Суфиева – взятие материала, проводка и заливка в парафиновые блоки, покраска препаратов, фотографирование и анализ препаратов, написание текста статьи.

В.А. Разенкова – фотографирование препаратов, подсчет клеток, статистический анализ полученных препаратов, работа с рисунками.

М.В. Антипова – нарезка материала, подсчет клеток.

Д.Э. Коржевский – дизайн эксперимента и редактирование рукописи статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Алексеева О.С. и др. Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга // Морфология. 2014. Т. 145. № 2. С. 67–69.

Суфиева Д.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Астроцитарные маркеры в таницитах дна третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе и при старении // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 3. С. 205–214.

Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G. et al. Microglia of the brain: origin, structure, functions // J. Evol. Biochem. Phys. 2019. V. 55. № 4. P. 257–268.

Anesten F., Santos C., Gidestrand E. et al. Functional interleukin-6 receptor-α is located in tanycytes at the base of the third ventricle // J. Neuroendocrinol. 2017. V. 29. № 12. P. e12546.

Bisht K., Sharma K.P., Lecours C. et al. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states // Glia. 2016. V. 64. № 5. P. 826–839.

Bleier R. Ultrastructure of supraependymal cells and ependymal of hypothalamic third ventricleof mouse // J. Comp. Neurol. 1977. V. 174. № 2. P. 359–376.

Bobbo V.C.D., Jara C.P., Mendes N.F. et al. Interleukin-6 expression by hypothalamic microglia in multiple inflammatory contexts: a systematic review // Biomed. Res. Int. 2019. P. 1365210.

Chowen J.A., Garcia-Segura L.M. Microglia, neurodegeneration and loss of neuroendocrine control // Prog. Neurobiol. 2019. P. 101720.

Erickson M.A., Banks W.A. Age-associated changes in the immune system and blood–brain barrier functions // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 7. P. 1632.

Gao Y., Tschöp M.H., Luquet S. Hypothalamic tanycytes: gatekeepers to metabolic control // Cell. Metab. 2014. V. 19. № 2. P. 173–175.

Joly J.S., Osório J., Alunni A. et al. Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs // Semin. Cell. Dev. Biol. 2007. V. 18. № 4. P. 512–524.

Kaur C., Rathnasamy G., Ling E.A. Biology of microglia in the developing brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2017. V. 76. № 9. P. 736–753.

Koopman A.C.M., Taziaux M., Bakker J. Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence // J. Neuroendocrinol. 2017. V. 29. P. 1–9.

Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V. et al. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // Eur. J. Histochem. 2015. V. 59. № 3. P. 2530.

Lannes N., Eppler E., Etemad S. et al. Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system // Oncotarget. 2017. V. 8. № 69. P. 114393–114413.

Lenz K.M., Nelson L.H. Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function // Frontiers in Immunology. 2018. V. 9. P. 698.

Lu J., Kaur C., Ling E.A. Intraventricular macrophages in the lateral ventricles with special reference to epiplexus cells: a quantitative analysis and their uptake of fluorescent tracer injected intraperitoneally in rats of different ages // J. Anat. 1993. V. 183 (Pt 2). P. 405–414.

Mendes N.F., Kim Y., Velloso L.A. et al. Hypothalamical microglial activation in obesity: a mini-review // Frontiers of Neuroscience. 2018. V. 12. P. 846.

Mesters P. The supraependymal cells of the rat hypothalamus: changes in their morphology and cell number during the ovarian cycle // Experientia. 1976. V. 32. № 10. P. 1329–1331.

Mestres P., Breipohl W. Morphology and distribution of supraependymal cells in the third ventricle of the albino rat // Cell Tissue Res. 1976. V. 168. № 3. P. 303–314.

Norden D.M., Godbout J.P. Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2013. V. 39. № 1. P. 19–34.

Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed. N.Y.: Elsevier/Academic Press, 2007. 456 p.

Prevot V., Dehouck B., Sharif A. et al. The versatile tanycyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism // Endocr. Rev. 2018. V. 39. № 3. P. 333–368.

Rodríguez E., Guerra M., Peruzzo B. et al. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations // J. Neuroendocrinol. 2019. V. 31. № 3. P. 1–29.

Schulz M., Engelhardt B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis // Cerebrospinal Fluid Res. 2005. V. 2. № 8. P. 1–14.

Takagi S., Furube E., Nakano Y. et al. Microglia continuously activated in circumventricular organs of mouse brain // J. Neuroimmunology. 2019. V. 331. P. 74–79.

Tan Y.L., Yuan Y., Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain // Mol. Psychiatry. 2019. P. 1–17.

Valdearcos M., Douglass J.D., Robblee M.M. et al. Microglial inflammatory signaling orchestrates the hypothalamic immune response to dietary excess and mediates obesity susceptibility // Cell. Metab. 2018. V. 26. P. 185–197.

Microglia and Tanycytes of the Rat Brain Infundibular Region in Early Postnatal Development and Aging

D. A. Sufieva[1, *], V. A. Razenkova[1], M. V. Antipova[1, 2], and D. E. Korzhevskii[1]

[1]*Institute of Experimental Medicine, ul. Akad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

[2]*Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7-9, St. Petersburg, 199034 Russia*

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

This research was aimed at studying the structure and spatial relationships of microglia and tanycytes in the mediabasal hypothalamus in postnatal development and aging. Brain sections of Wistar rats were analyzed using immunohistochemical methods at each of the following postnatal ages: day 7, day 14, day 30, 4 to 6 months, 20 months ($n = 3$ for each term). Different types of microglia were defined according to localization, morphological and functional features, and spatial relationships with tanycytes. In the infundibular region age-related changes in microglia activity were shown. The results will contribute to the establishment of microglia and tanycytes role in formation of barrier structures in the mediabasal hypothalamus and age-related peculiarities of central neuroimmunoendocrine regulation.

Keywords: microglia, tanycytes, infundibular regions, mediabasal hypothalamus, development, aging, immunohistochemistry

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 235–238

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

УДК 577.21,577.24,577.25,577.3

НЕЙРОНАЛЬНЫЙ СЧЕТЧИК ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ?

© 2020 г. В. Е. Дьяконова*

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

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

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.
После доработки 27.01.2020 г.
Принята к публикации 31.01.2020 г.

Делящиеся клетки накапливают большую часть мутаций при репликации ДНК, связанной с митозами. Как известно, обратным счетчиком возраста эукариотического организма, и потенциально накопленных мутаций его клетками является длина теломер. Геном нейронов, то есть неделящихся клеток, подвергается наибольшему мутированию уже после завершения дифференцировки, при их возбуждении и эпигенетических перестройках активности генома. При этом нейроны накапливают на порядок больше мутаций, чем делящиеся клетки. Есть ли в нейронах свой счетчик потенциально накопленных мутаций, независимо определяющий продолжительность жизни?

Ключевые слова: продолжительность жизни, мутации генома нейронов, эпигенетика, теломеры

DOI: 10.31857/S0475145020030064

Исследование Брюса Янкнера с соавторами, опубликованное в октябрьском номере Nature за прошлый год (Zullo et al., 2019), свидетельствует о том, что активность генов, связанных с регуляцией нейронального возбуждения, коррелирует у человека с продолжительностью жизни. У нематоды ортологи этих генов и нейрональное возбуждение определяют продолжительность жизни. Связь оказалась обратной: возбуждение сокращает жизнь.

Авторы сравнили транскриптомы фронтальной коры когнитивно-здоровых людей, ушедших из жизни в возрасте 70–80 лет и 85–100 лет ($N = 155$ и 117 соответственно). Главным отличием долгожителей оказалось снижение экспрессии генов, связанных с регуляцией возбуждения и возбуждающей межнейрональной сигнализации. Активность генов, связанных с тормозной сигнализацией (например, ГАМК), существенно не различалась, а ряда генов, регулирующих иммунный ответ, напротив, оказалась повышенной. В промоторных областях многих генов, активность которых была снижена у долгожителей, был обнаружен сайт связывания белка-репрессора REST. Ранее та же группа исследователей показала увеличение экспрессии гена *REST* с возрастом у людей (Lu et al., 2014). В новой работе обнаружена обратная корреляция между количеством матричной РНК белка REST и РНК генов нейронального возбуждения, характеризовавшихся пониженной экспрессией у долгожителей.

На мышах, нокаутированных по гену *REST*, была проверена связь этого гена непосредственно с активностью нейронов. Накопление флуоресцентной глюкозы, захват которой нейронами усиливается при возбуждении, действительно, оказался выше у генно-модифицированных мышей с выключенным геном *REST*. Старые нокаутированные мыши чаще, чем контрольные, проявляли эпилептиформную активность, демонстрировали более высокую чувствительность к антагонистам ГАМК, вызывающим перевозбуждение нервной системы. Продолжительность жизни нокаутированных и контрольных мышей не была сопоставлена, что вызывает некоторое удивление. Можно предполагать, что это связано с небольшим количеством животных, из которых практически все были использованы в гистологических и фармакологических экспериментах.

Итак, полученные результаты намекали на возможную связь между возбуждением и продолжительностью жизни, но не доказывали ее. Доказательную базу авторы попробовали получить, используя далекий от млекопитающих и человека объект – нематоду *Caenorhabditis elegans*.

В первую очередь, проверили влияние на продолжительность жизни нематод дикого типа двух веществ, снижающих нейрональное возбуждение через разные механизмы. Немадипин, блокатор кальциевых каналов L-типа, и ивермектин, агонист тормозных глутаматных рецепторов беспозвоночных, снижали свечение кальциевых флуоресцентных зондов, свидетельствующих о возбуждении нейронов, и достоверно увеличивали продолжительность жизни нематод. При этом вещества не повлияли на пищевое и моторное поведение червей. В следующей серии экспериментов ген дрозофилы, кодирующий рецептор к гистамину, отсутствующий в норме у нематод, встроили в геном нейронов *C. elegans*. Этот рецептор сопряжен с хлорным каналом, а вхождение хлора в клетку при активации рецептора приводит к ее торможению. Введение экзогенного гистамина приводило к снижению возбуждения нейронов у генно-модифицированных червей и увеличивало продолжительность их жизни. Затем были получены животные с избирательной экспрессией гистамин-чувствительного хлорного канала в субпопуляциях нейронов, синтезирующих преимущественно возбуждающие или преимущественно тормозные нейротрансмиттеры. Показано выраженное увеличение продолжительности жизни при торможении возбуждающих нейронов гистамином. Снижение экспрессии гена везикулярного транспортера ГАМК (преимущественно тормозный нейротрансмиттер у нематод), напротив, повышало возбуждение в нервной системе и снижало продолжительности жизни. Было проведено еще несколько подобных экспериментов в серии с изменением соотношения возбуждения-торможения в нервной системе нематод. Их результаты указывали на то, что продолжительность жизни увеличивается при подавлении возбуждения, и снижается при его повышении. А вот способность к обучению, напротив, повышалась при увеличении возбуждения в нервной системе, вызванном специфическим изменением пищевого рациона и глутаматных метаболических путей (Vohra et al., 2017).

У нематод есть ген *spr-4*, который можно считать ортологом гена *REST* млекопитающих. Ранее о нем было известно, что его продукт защищает клетки от повреждающих воздействий активных форм кислорода и некоторых других неблагоприятных воздействий. Следующая серия экспериментов была посвящена манипуляциям с этим геном и анализом продолжительности жизни нематод. Использовали недавно вошедший в обиход генных инженеров метод (RNA-guided endonuclease Cas9), позволяющий увеличивать экспрессию определенного гена. Повышение экспрессии гена *spr-4* снизило возбуждение нейронов и увеличило продолжительность жизни. Напротив, нокаутирование гена избирательно в нейронах привело к сокращению жизни нематод. Этот эффект оказался обратим при введении ивермектина, снижающего возбуждение. Был проведен транскриптомный анализ модифицированных нематод, который подтвердил изменение экспрессии генов, связанных с нейрональным возбуждением, у животных с измененной экспрессией *spr-4*. Авторы заключают, что *REST* и его ортологи выполняют эволюционно консервативную функцию, связанную с регуляцией возбуждения в нервной системе. Эта регуляция, в свою очередь, оказывает влияние на продолжительность жизни.

Очевиден вопрос, почему и каким образом возбуждение нейронов может регулировать продолжительность жизни? Пока в качестве ответа на этот вопрос авторы предложили гены – возможные мишени действия нейронального возбуждения. Это гены факторов транскипции: *FOXO1* у млекопитающих, экспрессия которого подавляется при возбуждении, и его возможный ортолог *daf-16* у нематод. Предполагается, что эти гены могут связывать нейрональную активность с метаболизмом. FOXO1 участвует в метаболизме глюкозы и инсулиновых метаболических путях в клетках мозга, вызывает апоптоз и тормозит клеточные деления у ненервных клеток.

Несмотря на очевидные выводы из результатов работы на нематодах, их применимость к млекопитающим остается под сомнением. Совершенно не исключено, что снижение возбуждения нейронов и повышение экспрессии *REST* у человека является естественным результатом старения. Причинно-следственные связи между продолжительностью жизни и экспрессией *REST* у млекопитающих не были выявлены: хотя мыши, нокаутированные по белку REST, были получены, почему-то не была исследована продолжительность их жизни. В то же время, есть дополнительные теоретические основания предполагать, что найденное явление может быть распространено и на других животных, обладающих нервной системой.

Выход этой работы Брюса Янкера оживил давнюю тему “платы за ум”. Даже беглый просмотр результатов заставляет вспомнить о повышенной возбудимости и тревожности крыс, мышей и дрозофил при отборе на когнитивные способности и про интригующую обратную связь между способностью к обучению и продолжительностью жизни дрозофил (обзор Дьяконова, 2015). Отбор на способность к обучению приводил к снижению продолжительности жизни на 15%, а отбор на продолжительность жизни – к ухудшению способности обучаться в молодом возрасте на 40% (Burger et al., 2008).

Известно, что возбуждение нейрона повышает выработку свободных радикалов, то есть потенциальных мутагенов. Недавно у млекопитающих (мыши) было показано широкое деметилирование генома клеток гиппокампа при возбуждении (Grassi et al., 2017), что, как известно, снижает защищенность генома от мутагенов. Из тысяч генов, изменивших свою активность после введения хлорида калия, вызывающего неспецифическое повышение электрической активности нейронов, у примерно 90% наблюдалось активное деметилирование, и только у 10% – обратный эффект. Используя модель вызванной стрессом депрессии, снижающей активность гиппокампа, авторы показали обратный эффект – подавление экспрессии гетерохроматинового релаксера – деметилазы GADD 45. Не только неспецифическое возбуждение, опосредованное хлоридом калия, но и классическое глутаматное возбуждение активирует пути, ведущие к активации *GADD45* и деметилированию (Sultan, Sweatt 2013). Эти данные свидетельствуют о том, что при возбуждении нейрона может одновременно увеличиваться выброс потенциальных мутагенов и снижаться защищенность генома от них, за счет деконденсанции хроматина и деметилирования ДНК.

С этим предположением согласуются данные по изучению геномов нейронов человека и мыши, в которых показано накопление мутаций, превышающее нормы для ненервных клеток (Evrony et al., 2012; Hazen et al., 2016). Важно, что большую часть мутаций нейроны приобретали уже во время взрослой жизни, а не в процессе нейрогенеза, включающего деление клеток-предшественников и репликации ДНК. Кроме того, мутации накапливались в эухроматиновых смысловых областях генома, и больше всего их было в тех генах, которые наиболее активно экспрессировались. Этим нейроны также отличались от ненервных клеток, которые, напротив, "умеют защищать от мутаций" именно те гены, которые они чаще используют. По-видимому, нейроны по какой-то причине не применяют такую защиту, либо она оказывается недостаточно эффективной при их скорости мутагенеза. Высказывались предположения, что снижение защиты может быть связано с пластичностью нервной системы, напрямую зависящей от пластичности генома. Действительно, зависимость когнитивных функций от эпигенетических перестроек активности генома клеток нервной системы показана уже во многих исследованиях (см. обзор Sweatt, 2016). Гипотеза А.Л. Крушинского о том, что за приобретение информации мозг платит не только энергетическую, но и информационную цену (Крушинский, 2013, 2014), получила вполне конкретное экспериментальное основание.

Сокращение продолжительности жизни нейронов при повышении их уровня возбуждения может быть защитой от неадекватного поведения испорченных клеток. Но в конечном счете общее сокращение жизни нервной системы приведет к уменьшению продолжительности жизни организма. Возможно, именно эти эффекты наблюдал Янкер в своей работе.

С большой вероятностью можно ожидать, что зависимость продолжительности жизни от нейронального возбуждения проявится наиболее явно на небольшом по количеству нейронов мозге, таком как мозг *C. elegans* с 300-ми нейронами. И, наоборот, чем больше будет нейрональная избыточность или попросту количество нейронов, тем слабее будет такая зависимость. Увеличение числа нейронов может служить не только усложнению системы, но и ее защите при случайном мутагенезе. Случайный мутагенез, сопровождающий активность клетки предполагает, и то, что увеличение числа нейронов станет защитой только в том, случае, если активность будет распределена между клетками. Если только часть нейронов будет постоянно участвовать в пластических перестройках, они также накопят мутации, как и в малом по числу нейронов мозге.

Просматривается интересная параллель с функцией теломер, ведущих отсчет клеточных делений и определяющих старение ненервных клеток (Olovnikov 1971, 1973). Репликация у ненервных клеток – процесс, наиболее отягощенный мутагенезом. Недавняя работа показала, что большинство канцерогенных мутаций организм накапливает именно во время репликаций ДНК при делении клеток, и в гораздо меньше степени в результате воздействия внешних факторов (Tomasetti et al., 2017). Таким образом, длина теломер, определяющая продолжительность жизни клетки, и в конечно счете организма, действительно может быть не столько индикатором возраста, сколько счетчиком потенциально-накопленных "закономерных" мутаций или "испорченности" генома. Искусственная активация теломераз, достраивающих теломеры после репликации, увеличивает продолжительность жизни клеток, но приводит к увеличению количества мутаций. Высоким уровнем теломеразной активности отличаются раковые клетки. Если то, за чем организму важно следить, это не возраст как таковой, а потенциальное количество накопленных повреждений генома, то в клетках нервной системы, накапливающих большинство мутаций не при делении, а при активной работе, можно ожидать существования иного счетчика.

По количеству репликаций можно оценивать вероятное накопление мутаций в ненервных клетках, у нейронов таким косвенным признаком может быть интенсивность и длительность возбужденного состояния. Есть ли такой же универсальный счетчик возбужденного состояния нейрона, как счетчик клеточных делений по длине теломерных участков в делящихся клетках, пока неизвестно. FOXO1, относящийся к семейству forkhead box – содержащих транскрпционных факторов, был предложен Брюсом Янкером в качестве эволюционно-консервативной мишени нейронального возбуждения. Однако он, скорее всего, является лишь одним из участников сложного каскада. Если счетчик существует, то он должен удовлетворять обязательному условию – необратимо менять свое состояние при процессах, связанных с возбуждением.

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

Дьяконова В.Е. Сколько стоят когнитивные способности? // Российский журн. когнитивной науки. 2015. Т. 2. № 2–3. С. 70–77.

Крушинский А.Л. Биофизические аспекты рассудочной деятельности // Формирование поведения животных в норме и патологии. К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского (1911–1984) / Под ред. Полетаевой И.И., Зориной З.А. М.: Изд-во Языки славянской культуры, 2013. С. 424–436.

Крушинский А.Л. Плата за решение задачи: биофизические предпосылки и возможные эволюционные последствия // Российский журн. когнитивной науки. 2015. Т. 2. № 1. С. 52–61.

Burger J., Kolss M., Pont J., Kawecki T.J. Learning ability and longevity: A symmetrical evolutionary trade-off in Drosophila // Evolution. 2008. V. 62. № 6. P. 1294–1304. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00376.x

Evrony G.D., Cai X., Lee E. et al. Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain // Cell. 2012. V. 151. № 3. P. 483–496.

Grassi D., Franz H., Vezzali R. et al. Neuronal activity, TGFβ-signaling and unpredictable chronic stress modulate transcription of Gadd45 family members and DNA methylation in the hippocampus // Cereb. Cortex. 2017. V. 27. № 8. P. 4166–4181. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx095

Hazen J.L., Faust G.G., Rodriguez A.R. et al. The complete genome sequences, unique mutational spectra, and developmental potency of adult neurons revealed by cloning // Neuron. 2016. V. 89. № 6. P. 1223–1236. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.004

Lu T., Aron L., Zullo J. et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease // Nature. 2014. V. 507. P. 448–454.

Olovnikov A.M. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1971. V. 201. № 6. P. 1496–1499.

Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. V. 41. № 1. P. 181–190.

Sultan F.A., Sweatt J.D. The role of the gadd45 family in the nervous system: a focus on neurodevelopment, neuronal injury, and cognitive neuroepigenetics // Gadd45. Stress Sensor Genes / Eds. Liebermann D.A., Hoffman B. Springer, 2013. P. 81–121.

Zullo J.M., Drake D., Aron L. et al. Regulation of lifespan by neural excitation and REST // Nature. 2019. V. 574. № 7778. P. 359–364. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1647-8

Vohra M., Lemieux G.A., Lin L., Ashrafi K. The beneficial effects of dietary restriction on learning are distinct from its effects on longevity and mediated by depletion of a neuroinhibitory metabolite // PLoS Biology. 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002032

Neuronal Counter of the Life Span: Does It Exist?

V. E. Dyakonova*

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia
**e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

Dividing cells accumulate most of the mutations during DNA replication associated with mitosis. The telomere length is a well known countdown counter of the age of an eukaryotic organism and of mutations potentially accumulated by its cells. The genome of neurons, i.e. non-dividing cells, accumulates the greatest number of mutations after the completion of cell differentiation, upon neuron excitations and epigenetic modifications of its genome activity. At the same time, neurons accumulate much more mutations than dividing cells. Do neurons have their own counter of potentially accumulated mutations that independently determines the life span expectancy?

Keywords: life span, neuronal genome mutations, epigenetics, telomeres

ОНТОГЕНЕЗ, 2020, том 51, № 3, с. 239–240

ПОТЕРИ НАУКИ

УДК 591

ПАМЯТИ ЮРИЯ СЕРГЕЕВИЧА ЧЕНЦОВА (1930–2019)

18 декабря 2019-го года ушел из жизни доктор биологических наук, профессор, заслуженный профессор Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова Юрий Сергеевич Ченцов – выдающийся российский ученый, педагог, признанный специалист в области морфологии и физиологии клетки.

Ю.С. Ченцов закончил биолого-почвенный факультет МГУ в 1954-м году, после чего поступил в аспирантуру кафедры гистологии, которую успешно завершил в 1957-м году. В течении нескольких лет Юрий Сергеевич работал в Институте морфологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР, а в 1962–1965-м годах – в радиологическом отделе Института атомной энергии. В 1965-м году Юрий Сергеевич занял должность заведующего отделом в новой Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ им. М.В. Ломоносова, формирующейся под руководством А.Н. Белозерского. В 1970-м году, продолжая работать в Межфакультетской лаборатории, Ю.С. Ченцов возглавил кафедру цитологии и гистологии биологического факультета МГУ, которой бессменно руководил 40 лет. С 2010-го года и до конца своих дней Юрий Сергеевич оставался профессором кафедры клеточной биологии и гистологии.

Ю.С. Ченцов ярко проявил свой дар исследователя в работах, относящихся к разным областям клеточной биологии – изучение структуры митотических хромосом и ядрышка, митохондрий, цитоскелета. Успеху этих исследований способствовало использование революционного для середины XX-го века метода электронной микроскопии. Юрий Сергеевич одним из первых в нашей стране оценил возможности данного метода и стал активно использовать электронную микроскопию для решения задач в области морфологии и физиологии клетки.

Наибольшую известность получили работы Ю.С. Ченцова в области изучения клеточного ядра. Оригинальной идеей этих исследований являлось предположение о том, что хроматин формируется в результате последовательной (иерархической) упаковки молекулы ДНК в фибриллы все большего диаметра. Первые исследования в этом направлении, проведенные еще в 60-е годы XX-го века, были посвящены морфологической характеристике толстых хроматиновых фибрилл – хромонем. Результаты этих исследований были обобщены в монографии, изданной в 1974-м году (Ченцов Ю.С., Поляков В.Ю. “Ультраструктура клеточного ядра”, М.: Наука, 1974 г.). Изучение структуры хроматина и хромосом было продолжено с использованием различных экспериментальных систем, в результате чего была показана дискретная организация 30 нм фибриллы и хромонемы. Эти данные сохраняют актуальность до настоящего времени.

Еще один цикл работ был связан с изучением морфологических и физиологических реакций клеток на повреждающие факторы, главным образом ингибиторы различных метаболических процессов, а также индукторы стрессовых реакций. Была предпринята попытка выявить специфические реакции клеток на разные воздействия, и это направление стало для кафедры одним из основных. Значительное число работ Юрия Сергеевича и его сотрудников связано с изучением цитоскелета. В этих исследованиях основное внимание уделялось центриолям – органеллам, играющим ключевую роль в организации цитоскелета, а значит трехмерной организации цитоплазмы. В ходе этих работ были детально описаны ультраструктурные изменения центриолей в ходе клеточного цикла, а также в разных типах клеток.

Виртуозное владение методами электронной микроскопии позволило Юрию Сергеевичу в сотрудничестве с Г.П. Георгиевым исследовать и впервые описать ультраструктуру “остаточных структур” клеточного ядра. В 1988-м году работа Ю.С. Ченцова с коллегами “Свойство негистоновых белков клеточного ядра формировать нехроматиновый структурный остов (ядерный матрикс)”, была зарегистрирована Государственным комитетом по делам изобретений и открытий СССР как открытие (Диплом № 348). В результате исследований, проводившихся совместно с В.П. Скулачевым, была выявлена новая форма организаций системы митохондрий в зрелых кардиомиоцитах – митохондриальный ретикулум, выявлены новые клеточные субструктуры – межмитохондриальные контакты, посредством которых осуществляется сопряжение митохондрий в кардиомиоцитах.

На протяжении многих десятилетий Ю.С. Ченцов успешно преподавал на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Его авторские курсы “Цитология”, “Нервная, эпителиальная и мышечная ткань”, “Методы микроскопии”, “Цитогенетика” за это время прослушали тысячи студентов-биологов.

Продуманная, четкая, размеренная манера изложения материала, многочисленные иллюстрации помогали студентам понимать принципы одной из центральных дисциплин современной биологии, привлекали в клеточную биологию молодых исследователей.

Значимым вкладом Ю.С. Ченцова в развитие биологии в России стал изданный им в 1978-м году учебник "Общая цитология". Учебник неоднократно переиздавался, а в 2004-м году переработанное и дополненное издание учебника вышло под названием "Введение в клеточную биологию". Наконец, в 2010-м вышел учебник "Цитология с элементами целлюлярной патологии", который был адаптирован для студентов медицинских вузов. Выход учебника, в котором излагались актуальные знания о биологии клетки, оказал существенное влияние на методику преподавания биологических дисциплин в вузах России. Учебник также использовался в качестве справочника по базовым вопросам биологии клетки, в том числе и научными сотрудниками. Многолетние усилия Юрия Сергеевича, его коллег и учеников способствовали превращению кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в ведущий научно-педагогический центр страны.

Научный и педагогический талант, лидерские качества, принципиальность и доброе отношение к людям привлекали к Юрию Сергеевичу учеников и последователей. Им создана крупная научная школа, из которой вышло множество самостоятельных ученых, продолжающих изучение различных аспектов биологии клетки, как в России, так и за ее пределами.

Научная и педагогическая деятельность Юрия Сергеевича Ченцова была отмечена Почетным званием Заслуженный работник Высшей школы Российской Федерации, Премией имени М.В. Ломоносова за научные работы профессоров, преподавателей и научных сотрудников I степени (Ломоносовская премия), Премией им. М.В. Ломоносова за педагогическую деятельность профессоров и преподавателей Московского университета.

От нас ушел большой ученый и неординарный человек, определивший целую эпоху российской клеточной биологии. Мы всегда будем помнить Юрия Сергеевича как принципиального, мудрого, доброго и отзывчивого человека.

Светлая ему память!

Г.Е. Онищенко, Е.В. Шеваль
galina22@mail.ru, *evsheval@gmail.com*