

СОДЕРЖАНИЕ

Том 52, номер 5, 2021

К 80-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ЭМБРИОЛОГИИ МОСКОВСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

Морфометрическое исследование пространственно-временной динамики
деформаций эмбриональной ткани в ходе гаструляции *Xenopus laevis*

Д. В. Бредов, И. В. Володяев, Н. Н. Лучинская

317

ОБЗОРЫ

Сердце крысы в пренатальном и постнатальном периоде онтогенеза

В. В. Иванова, И. В. Мильто, О. Н. Серебрякова, И. В. Суходоло

329

Применение концепции криобанка по отношению к диким и исчезающим
видам отряда хищных (Carnivora)

*С. Я. Амстиславский, В. И. Мокроусова, С. В. Окотруб,
Е. Ю. Брусенцев, В. А. Напримеров*

345

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Деацетилазы гистонов в процессе реагрегации клеток губки *Halisarca dujardinii*

*О. И. Кравчук, А. В. Бураков, Н. Г. Горностаев, К. В. Михайлов, К. И. Адамейко,
А. Д. Финошин, А. А. Георгиев, В. С. Михайлов, Ю. Э. Ерюкова, Г. А. Рубиновский,
Д. В. Заец, Г. Р. Газизова, О. А. Гусев, Е. И. Шагимарданова, Ю. В. Люпина*

367

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Глутаминсингтетаза в клетках формирующегося спинного мозга крысы

Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский

384

Contents

Vol. 52, No. 5, 2021

TO THE 80TH ANNIVERSARY OF THE EMBRYOLOGY DEPARTMENT IN LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

Spatio-Temporal Dynamics of Embryonic Tissue Deformations during Gastrulation
in *Xenopus laevis*: Morphometric Analysis

D. V. Bredov, I. V. Volodyaev, and N. N. Luchinskaya

317

REVIEWS

Rat Heart in the Prenatal and Postnatal Period of Ontogenesis

V. V. Ivanova, I. V. Milto, O. N. Serebrjakova, and I. V. Sukhodolo

329

Application of the Cryobank Concept to Wild and Endangered Carnivora Species

S. Ya. Amstislavsky, V. I. Mokrousova, S. V. Okotrub,
E. Yu. Brusentsev, and V. A. Naprimerov

345

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

Histone Deacetylases in the Process of *Halisarea dujardini* Cell Reaggregation

O. I. Kravchuk, A. V. Burakov, N. G. Gornostaev, K. V. Mikhailov, K. I. Adameyko,
A. D. Finoshin, A. A. Georgiev, V. S. Mikhailov, Y. E. Yeryukova, G. A. Rubinovsky,
D. V. Zayts, G. R. Gazizova, O. A. Gusev, E. I. Shagimardanova, and Y. V. Lyupina

367

MECHANISMS OF NORMAL AND PATHOLOGICAL TISSUE DEVELOPMENT

Glutamine Synthetase in the Cells of the Developing Rat Spinal Cord

E. A. Kolos and D. E. Korzhevskii

384

К 80-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ЭМБРИОЛОГИИ МОСКОВСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

УДК 57.01+577

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННО-
ВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКИ ДЕФОРМАЦИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТКАНИ
В ХОДЕ ГАСТРУЛЯЦИИ *XENOPUS LAEVIS*

© 2021 г. Д. В. Бредов^{a, b}, *, И. В. Володяев^a, Н. Н. Лучинская^a

^aКафедра эмбриологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

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

*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2021 г.

После доработки 26.05.2021 г.

Принята к публикации 27.05.2021 г.

В основе изменения формы эмбриона лежат как локальные, так и глобальные деформации тканей. Согласно законам классической механики, источником деформации может являться только механическая сила. Локализовать механические силы и качественно оценить их величину можно на основе динамики деформаций тканей эмбриона, обусловленных этими силами. Один из основных источников таких деформаций – различия скорости и направления движений соседних клеток. Мы детально описали движение клеток в эпиктодерме супрабластопоральной области (СБО) средней гаструлы *Xenopus laevis*. Была выявлена пространственная неоднородность движения клеток СБО; вдоль медиолатеральной оси эмбриона обнаружены регионы, различающиеся по средней скорости движения клеток. В частности, наибольшая скорость и сонаправленность движений клеток чаще всего наблюдались в медиальной зоне СБО. Анализ формы клеток показал, что именно в медиальном регионе СБО, который первым вовлекается в инволюцию, происходят наиболее активные перегруппировки клеток, связанные с формированием розеток. Мы предполагаем, что такие перегруппировки позволяет компенсировать растяжение материала медиальной зоны СБО в ходе инволюции.

Ключевые слова: гаструляция, бластопор, морфогенез, механические силы, движения клеток, *Xenopus laevis*

DOI: 10.31857/S0475145021050025

ВВЕДЕНИЕ

Процессы морфогенеза в эмбриональном развитии сопровождаются значительными деформациями тканей. Источником деформации биологических тканей является механическая сила (Murray, 2003; Davidson, 2011), поэтому для детального изучения механизмов морфогенеза необходимо локализовать силы, приводящие к наблюдаемым в морфогенезе деформациям, и выявить механизмы их возникновения.

Наиболее ранней методикой локализации механических сил является анализ скорости и амплитуды расхождения краев ткани в области локального надреза (т.е. деформации ткани после релаксации существующего напряжения). Если величина деформации пропорциональна действующей в этой области силе, возможно качественное описание распределения сил в эмбриональных тканях. Такое описание можно осуществить, сравнив величину деформации после надреза в различных участках

эмбриона на разных стадиях развития. Исследования с применением этого метода показали, что в эмбрионе механическая сила имеет неоднородное пространственное распределение (называемое также паттерном), качественно изменяющееся в ходе развития (Belousov et al., 1975). Экспериментальная релаксация этих напряжений или их имитация в эктопических участках оказывает влияние на ход морфогенетических процессов в эмбрионе или экспланатах эмбриональной ткани (Belousov et al., 1990, 2000; Chien et al., 2015).

Метод надрезов сохранил актуальность для задач, требующих качественной оценки механических сил в тканях (Ma et al., 2009; Campinho et al., 2013; Hara et al., 2013). В настоящее время для регистрации и исследования механических сил в биологических тканях стал доступен широкий спектр методик. Одними из наиболее распространенных являются методики, основанные на применении FRET-зондов. Это флуоресцентные мик-

розонды, которые позволяют оценить субклеточные деформации по падению интенсивности флуоресценции, вызванном расхождением двух связанных молекул флуорофора (Gaynard, Borghi, 2016; Eroshkin et al., 2018). Флуорофоры в составе такого зонда связаны между собой молекулой с известной жесткостью, что позволяет по зарегистрированной деформации зонда рассчитать воздействовавшую на него силу. Качественную оценку механических сил также позволяют произвести эластичные или эмульсионные зонды. Зная механические свойства материала, из которого изготовлен таковой зонд, можно по деформации зонда вычислить силу, которая к ней привела (Campàs et al., 2014; Mohagheghian et al., 2018).

Качественно иной подход был предложен Streichan с соавторами, картировавшими механические напряжения в тканях гаструлы *Drosophila melanogaster* на основании пространственной анизотропии распределения миозина (Streichan et al., 2018). Так как актомиозиновый комплекс является основным источником механической силы в ходе движений и перегруппировок клеток, неоднородность его распределения определяет пространственный паттерн механических напряжений в ткани. Измерив концентрацию миозина в различных регионах эмбриона, авторы обнаружили, что его пространственное распределение описывается тремя характерными паттернами, сменяющими друг друга в ходе гаструляции. На основе этих измерений исследователи смоделировали карту механических напряжений, для каждого из трех пространственных паттернов миозина (Streichan et al., 2018). Таким образом, данная работа косвенно показывает, что на каждой стадии развития *D. melanogaster* формируется специфический паттерн механических напряжений. Этот результат принципиально схож с результатом работы группы Белоусова, картировавшей механические напряжения методом надрезов (Belousov et al., 1975). Картирование механических напряжений, произведенное Streichan с соавторами (Streichan et al., 2018), несет не только описательную функцию. На основании этого картирования авторы рассчитали движения клеток поверхностного слоя, которые должны возникнуть под действием смоделированных механических напряжений. Предсказанные таким методом движения клеток совпали с реально зарегистрированными. Они, как и пространственное распределение миозина, характеризуются тремя хронологически последовательными паттернами (Streichan et al., 2018). Паттерн движений клеток представляет собой векторное поле – совокупность векторов, каждый из которых описывает ток материала через выбранную точку исследуемой области эмбриона (Zamir et al., 2008; Tambe et al., 2011; Brunet et al., 2013). Таким образом, стадиеспецифические паттерны механических напряжений с

большой вероятностью позволяют предсказать морфогенетические движения в нормальном развитии.

Однако, если продолжительность гаструляции превышает характерное время клеточных перегруппировок, то последние должны привести к изменению существующего паттерна механических сил (Mongera et al., 2018). Для решения подобной задачи необходимо связать данные о клеточных движениях с изменением локализации и/или величины механических сил в определенный период развития.

Качественный подход к описанию движений клеток называется кинематическим. Данный подход основан на регистрации координат клеток и последующем расчете производных от них величин (скоростей смещения, ориентации смещений и др.). (Davidson, 2011). В этом случае, под “координатами клетки” обычно понимают координаты геометрического центра клетки или ее ядра (Diz-Muñoz et al., 2010; Heller et al., 2016). Кинематическое описание позволяет оценить такие параметры, как пространственное распределение и временная динамика скоростей клеточных смещений, их ориентация, динамика смены соседей. Эти параметры позволяют установить, насколько активно перемешиваются клетки внутри ткани и, следовательно, насколько выражено релаксируются в ней напряжения. В силу неинвазивности, кинематический подход позволяет успешно исследовать развитие *in vivo* (Blanchard et al., 2009; Bi et al., 2016; Mongera et al., 2018; Schaumann et al., 2018).

Однако статистический анализ только координат центров клеток не позволяет связать изменение формы клеток с перемещением центров клеток. Для более содержательного описания деформации в ткани нужно учесть изменения формы самой клетки. Это позволит качественнее оценить пространственное распределение механических сил в ткани в ходе морфогенетических движений.

Данный подход было бы особенно интересно применить к модельным системам, в которых механические силы уже были картированы иными методами. Одной из наиболее подходящих под данную задачу модельных систем является гаструла *X. laevis*. Для гаструлы *X. laevis* были картированы механические силы и описана общая картина клеточных движений (Keller, 1978).

Движения клеток начинаются на стадии поздней бластулы (ст. 8) с радиальной интеркаляцией в крыше бластоцеля (Szabó et al., 2016). Так как радиальная интеркаляция сопровождается увеличением площади поверхности тканевого пласта, в крыше бластоцеля возникает избыток клеточного материала, который начинает смещаться вентральном направлении в ходе эпидермии. Одно-

временно, на дорсальной стороне эмбриона начинает формироваться бластопор. На стадии 10 начинается ключевой для гастроуляции *X. laevis* тип клеточных движений – инволюция материала мезодермальной закладки. Инволюция, начинаясь на дорсальной стороне эмбриона, приводит к углублению бластопора. К стадии 10.5 бластопор начинает распространяться в латеральных направлениях (к стадии 11.5 он сомкнется на вентральной стороне зародыша), а прогрессирующая интернализация материала на дорсальной стороне формирует дорсальную губу бластопора. Через нее происходит наиболее активная миграция клеток внутрь эмбриона. Зону, расположенную непосредственно анималнее дорсальной губы бластопора, называют супрабластопоральной областью (СБО, в англоязычном варианте – *dorsal marginal zone, DMZ*). Более глубокие клетки СБО составляют материал хордомезодермы, поверхностные – материал нейральной эктодермы. Инволюировавшие клетки хордомезодермы вовлекаются в движения медиолатеральной, или конвергентной, интеркаляции. В ходе этих движений каждая из клеток удлиняется вдоль медиолатеральной оси и формирует на концах направленные выросты, которые образуют С-кадгериновые контакты с телами соседних клеток. Затем, за счет сократительной активности миозина клетки встраиваются друг между другом вдоль медиолатеральной оси. Клетки эктодермы СБО *X. laevis* к этому моменту оказываются вовлечены в движения эпиволии (которые завершатся к стадии 11.5), но также осуществляют и конвергентную интеркаляцию (Keller, 1978; Keller et al., 2000; Keller, Sutherland, 2020). Они осуществляют движения интеркаляции путем сокращения клеточных границ, ориентированных в медиолатеральном направлении с последующим формированием в зоне контакта новой границы, ориентированной в антиперио-постериорном направлении (Butler, Wallingford, 2018). Интересно, что движения конвергентной интеркаляции осуществляют не только глубокие клетки эктодермы, но и ее поверхностный слой – эпигангтодерма, который является эпителиальной тканью. Последнее означает, что конвергентная интеркаляция происходит в пласте клеток, механически связанных апикальным комплексом клеточных контактов, включающем адгезионные и плотные контакты (Higashi et al., 2016).

Особенный интерес представляет исследование клеточной подвижности именно в эпителиальных тканях. Эпителиальные ткани наиболее доступны для наблюдения, в особенности в интактных зародышах, благодаря чему через изменение морфометрических параметров их клеток возможно зарегистрировать действие сил, создаваемых подлежащими тканями эмбриона (Morita et al., 2012). Соседние клетки внутри эпителиаль-

ного пласта могут отличаться скоростью и направлением движения. Эти различия могут являться одним из источников деформаций ткани (Vasilyev et al., 2012), приводящей к изменению паттерна механических сил. Хотя описание движений клеток поверхностного слоя СБО уже было произведено ранее (Keller, 1978), оно не включало подобный кинематический анализ движений клеток. Из-за этого оказывается невозможным связать клеточные движения с возникающими в ткани деформациями. К тому же, описание (Keller, 1978) не учитывает данные о паттернах механических напряжений при гастроуляции амфибий (Bellousov et al., 1975), а также описания клеточных переупаковок (Solnica-Krezel, 2005; Blankenship et al., 2006).

Целью данной работы было картировать деформации эпигангтодермы СБО гастроулы *X. laevis* на основании наблюдавшихся в этой области клеточных движений.

Для достижения этой цели было необходимо измерить скорости движения клеток, направление их смещения, а также охарактеризовать динамику их формы.

Мы произвели кинематическое описание движений клеток в СБО средней гастроулы *X. laevis*, охарактеризовав для каждой клетки величину и направление смещения на каждом из интервалов цейтраферной съемки. Мы обнаружили, что регионы, расположенные вдоль медиолатеральной оси, различаются по значениям средней скорости и сонаправленности движений клеток. Анализ формы клеток выявил, что область с наиболее высокими значениями средней скорости и сонаправленности характеризуется наиболее активными перегруппировками клеток. Мы предположили, что наблюдавшиеся перегруппировки клеток могут служить способом компенсации растяжения ткани в ходе гастроуляционных движений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование эмбрионов

Икру *X. laevis* получали согласно стандартному протоколу (Sive et al., 2000), оплодотворяли *in vitro* и культивировали в 0.1 Marc's Modified Ringer (MMR) (Sive et al., 2000) при комнатной температуре. Стадию развития эмбрионов определяли согласно таблицам нормального развития (Nieuwkoop, Faber, 1967).

Инъекция РНК

Для визуализации клеточных границ осуществляли инъекцию мРНК мембранныго (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркеров. мРНК синтезировали с имеющихся в лаборатории плазмид pCS2+/GAP43-GFP и pCS2+/H₂B-mCherry, ко-

торые любезно предоставил доктор Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe). Выделение целевых плазмид после амплификации осуществляли с помощью набора Plasmid Mini-prep (Evrogen), синтез РНК – с помощью набора mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription (Invitrogen), согласно предоставленному производителем протоколу. Оба набора были любезно предоставлены С.В. Кремнёвым (каф. эмбриологии МГУ им. М.В. Ломоносова).

Зародышей на стадиях от 2-х до 4-х бластомеров переносили из 0.1 ММР в раствор фиколла на 0.3 ММР. Затем осуществляли инъекцию мембранных (РНК GAP43-GFP) и ядерного (РНК H2B-mCherry) маркеров общим количеством 230 пг в случае GAP43-GFP и 230 пг в случае H2B-mCherry. Инъекцию производили в каждый из двух аниальных бластомеров, суммарный объем инъекции составлял 4.6 или 9.2 нл. После инъекции зародышей оставляли в растворе фиколла на 0.3 ММР и помещали в термостат с температурой 14–15°C для предотвращения образования проптрузий в местах инъекции. Через 7–8 ч раствор фиколла меняли на 0.1 ММР, после чего продолжали культивирование при температуре 14–15°C до достижения зародышами стадии 10–10.5 согласно таблицам нормального развития.

Съемка на конфокальном микроскопе

На стадии 10.5 зародышей переносили в 1× ММР, снимали желточные оболочки с помощью двух металлических пинцетов и оставляли на 5 мин для компенсации стресса от снятия оболочек. По прошествии 5 мин зародыши переносили в 35 мм чашки Петри с дном из покровного стекла, заполненные 1% агарозой с низкой температурой плавления на 1× ММР. Зародыши ориентировали запаянной стеклянной пипеткой Пастера внутри сделанных в агарозе лунок так, чтобы медиальный участок СБО каждого эмбриона оказался вблизи покровного стекла. После этого чашку устанавливали в лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV-10i и осуществляли цейтраферную микрофотосъемку. В связи с наличием большого количества желтка в клетках *X. laevis*, визуализация флуоресценции вблизи базального отдела клеток затруднена. Поэтому в ходе съемки регистрировали единичный оптический срез вблизи апикальной поверхности клеток эпизодермы. В дальнейшем, под формой клетки мы будем понимать форму сечения клетки, зарегистрированного на таком оптическом срезе. Для съемки использовали 10× 0.4 NA объектив UPLSAP и цифровое увеличение ×1.8 (суммарное увеличение т. о. составило ×18). Съемку производили в течение часа с частотой 1 кадр/мин, время съемки единичного кадра – 8 с, интенсивность обоих лазеров 30%. Для обработки использовали данные

по эмбрионам, дожившим до стадии хвостовой почки.

Морфометрический анализ

Распознавание клеточных границ на кадрах цейтраферной съемки осуществляли с помощью свободно распространяемого программного обеспечения EpiTools 2.1.6 (Heller et al., 2016). При необходимости, перед морфометрическим анализом результаты распознавания клеточных границ корректировали вручную с помощью плагина CellEditor в составе EpiTools 2.1.6. Данные морфометрического анализа экспортировали через соответствующую опцию плагина CellOverlay, и затем осуществляли статистическую обработку данных в программах ICY, Microsoft Excel 365, RStudio 1.4.1106 и STATISTICA 10.0.

Смещения клеток оценивали с помощью модуля CELL_OUTLINE в составе ПО EpiTools 2.1.6. С помощью данного модуля на каждом из кадров цейтраферной съемки вычисляли координаты геометрического центра каждой из клеток на оптическом срезе и экспортировали полученные значения в Microsoft Excel 365. Затем для каждой клетки в Microsoft Excel 365 рассчитывали величину смещения и угол между направлением смещения клетки и антерио-постериорной осью за время между двумя кадрами.

1) Смещение рассчитывали, как кратчайшее расстояние между геометрическим центром клетки на двух последовательных кадрах. Для этого вычисляли отдельно разность координат X (ΔX) и разность координат Y (ΔY) центра масс клетки между двумя последовательными кадрами, после чего находили смещение D как корень из суммы квадратов ΔX и ΔY (т. к. смещение D и его компоненты ΔX и ΔY образуют прямоугольный треугольник, где D – гипотенуза, а ΔX и ΔY – катеты) (рис. 1). Так временной промежуток между кадрами составляет 1 мин, рассчитанное перемещение D фактически представляет собой среднюю скорость смещения клетки с размерностью мкм/мин.

2) Для вычисления угла α (принимает значения от 0° до 360°) между вектором смещения клеток и антерио-постериорной осью (совпадает с осью 0°–180°, где 0° соответствует постериорному полюсу, а 180° – антериорному) сначала находили тангенс угла смещения $\text{tg}(\alpha) = \Delta X / \Delta Y$, после чего с помощью функции арктангенс (ATAN) находили величину угла смещения в градусах.

3) Сонаправленность смещений клеток оценивали с помощью параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$, где α – угол между направлением смещения отдельной клетки и антерио-постериорной осью эмбриона (α принимает значения от 0° до 360°), а скобки $\langle \rangle$ означают усреднение по нескольким значениям. Использование функции cos вместо

непосредственного значения угла позволяет одновременно оценить как параллельность траектории смещения клетки антерио-постериорной оси (по модулю значения \cos), так и направление смещения клетки (по знаку величины \cos): если траектория смещения и антеропостериорная ось параллельны и сонаправлены, угол между ними равен 0° , и S принимает значение равное $\cos(0^\circ) = 1$, если же они параллельны, но имеют противоположные направления, угол между ними равен 180° , а S принимает значение равное $\cos(180^\circ) = -1$ (Kemkemer et al., 2006; Reffay et al., 2011).

4) Форму клеток оценивали через эксцентриситет – числовую характеристику конического сечения, показывающую степень его отклонения от окружности. Выбор эксцентриситета для данной задачи объясняется тем, что форму клеток удобно описывать с помощью аппроксимации эллипсом (или окружностью), который является частным случаем конического сечения. Также, эксцентриситет является удобной оценкой формы клеток, так как отражает изменение соотношения длины большой и малой осей клетки. Экс-

центриситет рассчитывали как $E = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$, где a – длина большой оси, b – длина малой оси. Длину большой и малой оси для каждой клетки на кадре вычисляли с помощью модуля ELLIPSE_FIT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ пространственно-временной динамики скоростей смещений клеток

Для количественного описания деформаций эпигастодермы СБО в ходе гастроуляции *X. laevis*, мы провели анализ пространственного распределения скоростей смещений клеток в исследуемой области, включающей 88 клеток (рис. 2а). На момент начала съемки эмбрион достиг стадии 10.5. На данной стадии начинается интернализация колбовидных клеток на дорсальной стороне эмбриона (рис. 2а' и 2а", пунктирная стрелка), а бластосторон начинает распространяться в латеральных направлениях, формируя латеральные губы (рис. 2а' и 2а", сплошные стрелки).

Количественное исследование пространственной анизотропии тканевых деформаций должно опираться на алгоритм, который позволял бы выявлять внутри исследуемой области зародыша регионы с наиболее выраженным деформациями. Выявив такие регионы, можно провести более детальный, сравнительный анализ характерной для каждого из них пространственно-временной динамики деформаций. Наиболее удобной функцией для этой задачи является параметр порядка S , т.к. он позволяет выявить регионы и временные интервалы с наименее сонаправленными смещениями клеток, и потому потенциально наиболее вы-

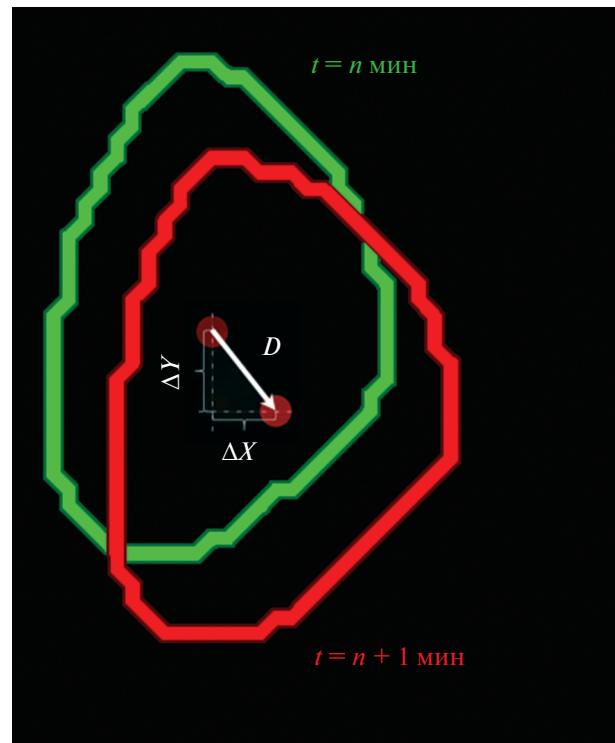
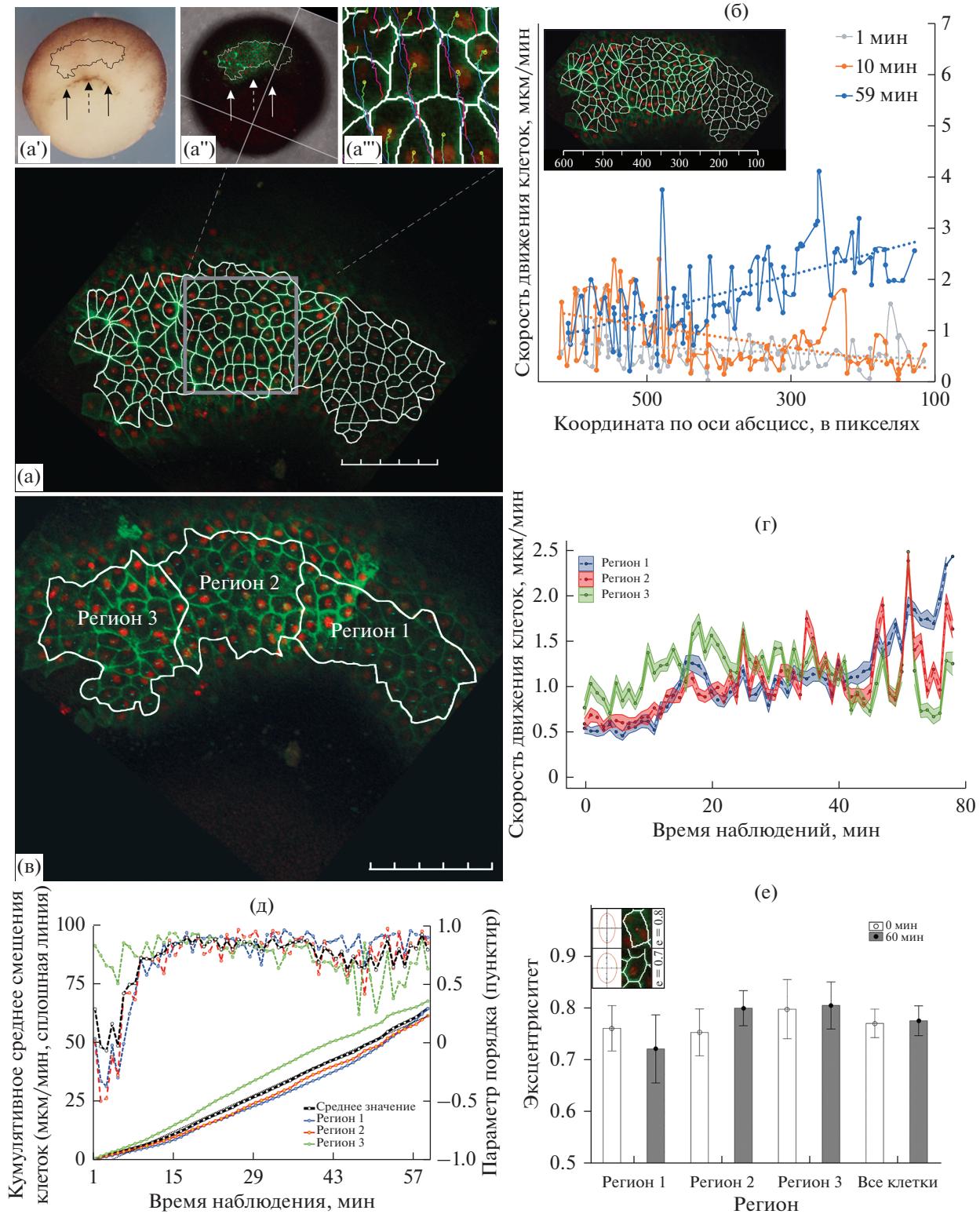


Рис. 1. Описание смещения индивидуальной клетки. ΔX : изменение координаты геометрического центра масс (красная точка) по оси X ; ΔY : изменение координаты геометрического центра клетки по оси Y ; D – результатирующее смещение; вектор D и его компоненты ΔX и ΔY образуют прямоугольный треугольник, $D = \sqrt{(\Delta X)^2 + (\Delta Y)^2}$.

раженными деформациями. Параметр порядка рассчитывали как косинус угла между вектором смещения отдельной клетки и антеропостериорной осью эмбриона (которая совпадала с осью 0° – 180° , где 0° соответствует вегетативному полюсу, а 180° – анимальному). Однако выраженность деформации зависит не только от направления движения клеток, но и от того, на какое расстояние они расходятся при смещении. Для этого необходимо соотнести значение скорости смещения клеток со значением параметра порядка. Скорость V рассчитывали как частное смещения отдельной клетки D за промежуток времени между двумя кадрами и продолжительности этого промежутка t ($V = \frac{D}{t}$). Так как интервал между кадрами цейтраферной съемки составлял 1 мин, смещение клетки за промежуток времени между двумя кадрами представляет собой ее среднюю скорость в мкм/мин.

Для каждого кадра цейтраферной съемки мы упорядочили индивидуальные номера расположенных на нем клеток согласно их положению вдоль медиолатеральной оси эмбриона (т.е. со-



гласно значению координаты соответствующей клетки по оси абсцисс). Затем построили график, на котором по оси абсцисс откладывали координаты геометрических центров клеток относительно медиолатеральной оси эмбриона, а по оси ор-

динат — скорость смещения каждой клетки (рис. 2б). На полученном графике видно, что изначально скорости смещения клеток были равномерно распределены вдоль медиолатеральной оси (рис. 2б, серая линия). В течение наблюдения скорости

Рис. 2. (а) Общий вид дорсальной области эмбриона *X. laevis* на стадии 10–10.5 с распознанными клеточными границами (а, линейка соответствует 100 мкм, деление – 20 мкм) и положение исследуемой области в эмбрионе (а', а''). Для каждой из распознанных клеток (а) была прослежена траектория ее смещения в течение часа (а''). Для каждой траектории цветовым кодом обозначены ее начальный (желто-зеленый интервал), промежуточный (сине-фиолетовый интервал) и конечный (оранжево-красный интервал) участки. (б) Оценка пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси. В течение наблюдения распределение величины смещений отклоняется от равномерного (1 мин наблюдения, серая сплошная линия), и наибольшие значения смещений превалируют в медиальной (10 мин наблюдения, оранжевая сплошная линия) или латеральной (59 мин наблюдения, синяя сплошная линия) областях губы бластопора. По оси абсцисс: координата геометрического центра клетки. По оси ординат: величина смещения за интервал между текущим и следующим кадрами. Пунктирная линия – линейный тренд. На графике приведены данные для начала (смещения за 1-ю и 10-ю минуту наблюдения) и конца (59-я минута наблюдения) съемки. (в) Для оценки динамики пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси вся исследуемая область была разбита на три региона по 29–30 клеток (линейка соответствует 100 мкм, деление – 20 мкм). (г) Чтобы статистически оценить региональные различия скоростей смещения, для каждого из регионов была рассчитана средняя скорость смещения клеток. Центральная линия – средняя скорость смещения в регионе, заливка – стандартная ошибка среднего. (д) Для более удобного анализа для каждого из регионов были рассчитаны кумулятивное среднее скоростей смещения клеток и среднее параметра порядка для каждого из кадров съемки. Сплошные линии (ось ординат слева): кумулятивное среднее смещение клеток (средние скорости смещения клеток были последовательно суммированы в течение всего времени наблюдения). Полученный график демонстрирует, что наибольшие значения смещений клеток в начале наблюдения обнаруживаются в регионе 3. Затем динамика скоростей уравнивается во всех трех регионах, но к концу наблюдения достигает наибольших значений в регионе 1. Пунктирные линии: среднее значение параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$ для каждого из регионов. (е) Для выявления к локальным деформациям внутри регионов оценили динамику эксцентриситета клеток. Нам не удалось выявить статистически достоверных различий между эксцентриситетом клеток в начале и в конце наблюдения во всех трех регионах, ровно как и в среднем по всем клеткам исследуемой области.

смещений принимали наибольшие значения в медиальной (рис. 2б, оранжевая линия) или наиболее латеральных областях губы (рис. 2б, синяя линия), формируя градиент вдоль медиолатеральной оси. Чтобы статистически оценить пространственную неоднородность скоростей движения клеток, мы подразделили исследуемую область на отдельные регионы, так, чтобы каждый состоял из 29–30 клеток (рис. 2в). В результате исследуемая область оказалась подразделена на 3 региона.

Для каждого из трех получившихся регионов проследили динамику средней скорости смещений клеток и среднего параметра порядка S . Абсолютные значения средней скорости движения клеток в регионе 3 превышают таковые в регионах 1 и 2, и в течение первых 15–18 мин съемки демонстрируют тенденцию к возрастанию (рис. 2г, зеленая линия). Однако, в силу выраженных колебаний средней скорости смещений отдельных клеток достоверно выявить тренд при подобном представлении данных затруднительно. Для этого удобнее выводить на график кумулятивное среднее скоростей смещения клеток, т.е. не абсолютные значения средней скорости, а последовательность сумм средних скоростей за все предшествующие данному интервалы наблюдения (рис. 2д, сплошные линии, ось ординат слева). Тогда график будет иметь более линейную форму, что упростит сравнение регионов между собой. Такой график более отчетливо демонстрирует, что, хотя изначально средние скорости клеток практически идентичны для всех регионов, в первые 15–18 мин наблюдения средняя скорость клеток в регионе 3 (рис. 2д, сплошная зеленая линия) растет быстрее таковых в регионах 1 и 2 (рис. 2д, си-

няя и красная сплошные линии соответственно), и в среднем по всем клеткам исследуемой области зародыша (рис. 2д, черная сплошная линия). Это можно определить по более пологой форме графика на этом интервале. Одновременно с этим, мы сравнили среднее значение параметра порядка S для каждого региона со средним для всех 88 клеток образца, что позволило выявить региональные различия в сонаправленности клеточных движений (рис. 2д, пунктирные линии, ось ординат справа). Так, значение параметра порядка в регионе 3 (рис. 2д, зеленая пунктирная линия) систематически превышает среднее по всем клеткам образца в течение первых 6 мин наблюдения (рис. 2д, черная пунктирная линия). Этот вывод подтверждается статистически с помощью критерия Манна–Уитни: для первых 6 кадров съемки значение параметра порядка в регионе 3 статистически достоверно отличается от среднего для всех клеток эмбриона (значение p -value меньше 0.01), в отличие от регионов 1 и 2 (рис. 2д, синяя и красная пунктирные линии соответственно).

На интервале 6–24 мин наблюдения параметр порядка S возрастает во всех регионах, а его колебания уменьшаются. Одновременно с этим возрастают и скорости движения клеток: в области 19 мин для регионов 1 и 2 и в области 17 мин для региона 3 на графиках средней скорости явно присутствуют точки перегиба. В области 31-й минуты наблюдения значения параметра порядка в регионах 1 и 2 начинают превышать таковые в регионе 3. С 47-й мин наблюдения среднее значения параметра порядка в регионе 3 начинает статистически достоверно отличаться от среднего по зародышу в меньшую сторону. Одновременно с этим в регионе 3 замедляется рост средней скоро-

сти смещения клеток, что можно определить по возникновению второго перегиба на соответствующем графике (рис. 2д, сплошная зеленая линия, начиная с 27-й мин). Одновременно, в регионах 1 и 2 рост средней скорости продолжается. Это приводит к тому, что к концу наблюдения отличия в значениях средних скоростей значительно уменьшаются для всех трех зон, а графики кумулятивных средний смещения клеток во всех трех регионов отклоняются от линейной зависимости. Наиболее наглядно это отклонение визуализируется при сравнении графиков кумулятивного среднего смещения клеток для регионов с графиком для всех 88 клеток, который с высокой степенью достоверности аппроксимируется линейной зависимостью ($R^2 = 0.9953$).

Таким образом, скорости и сонаправленность движений клеток в регионе 3 систематически отличается от регионов 1 и 2.

Анализ пространственно-временной динамики формы клеток

Чтобы найти причину выявленной неоднородности движений клеток, мы проанализировали форму границ клеток на полученной серии изображений в каждом из трех регионов. Важно уточнить, что в ходе съемки регистрировали единичный оптический срез вблизи апикальной поверхности клеток эпизодермы. В связи с этим, общей границей для пары соседних клеток мы будем называть зону контакта мембран этих клеток, попавшую на оптический срез, а формой клетки — форму сечения клетки, зарегистрированного на оптическом срезе.

Чтобы оценить локальные деформации внутри отдельных регионов, мы проанализировали динамику эксцентризитета (меры отклонения формы клетки от окружности) отдельных клеток в исследуемых регионах. Нам не удалось выявить статистически значимых различий между средним значением эксцентризитета клеток в начале и в конце наблюдения, как в целом по эмбриону, так и внутри отдельных регионов (рис. 2е). Однако анализ формы клеток позволил выявить множество клеточных структур, называемых розетками. Подобные структуры являются промежуточным этапом специфических, пространственно ориентированных переупаковок клеток (рис. 3а–3а''). Розетка формируется за счет сокращения общих границ внутри группы клеток, выстроенных в два параллельных тяжа (рис. 3а). Каждая клетка внутри данной пары клеточных тяжей сокращает свою границу, которой она контактирует с клетками из соседнего тяжа так (рис. 3а'), что на оптическом срезе граница контакта между клетками двух тяжей сходится в точку (рис. 3а''). На кадре съемки такая точка возникает из-за прохождения оптического среза через общую границу для всех

клеток розетки (сонаправленную апикобазальной оси). Затем клетки розетки группируются в два новых тяжа, перпендикулярных ориентации первоначальных тяжей (рис. 3а''). Такие клеточные переупаковки могут иметь морфогенетическое значение. В частности, в гаструляции *D. melanogaster* такие перегруппировки опосредуют аксиальное удлинение эмбриона, приводя к реориентации тяжей клеток в антериопостериорном направлении (Blankenship et al., 2006). Чтобы оценить, как переупаковки клеток через розетки соотносятся с картой механических напряжений в гаструляции *X. laevis*, мы проследили переупаковки клеток розеток, попавших в исследуемую область.

На кадрах съемки удалось идентифицировать 9 розеток, из них 7 были локализованы в регионе 3, 1 — в регионе 2, и 1 — в регионе 1. Распознать все составляющие их клетки удалось только для 5 из 9 идентифицированных розеток. Из этих 5 розеток 4 были локализованы в регионе 3, 1 — в регионе 2. Интересно, что формирование розетки в регионе 2 последовало за делением одной из клеток.

Ранее, с помощью анализа клеточной морфологии на фиксированных эмбрионах было продемонстрировано, что розетки преимущественно локализуются в медиальной области СБО (Evstifeeva et al., 2010). Эти данные позволяют нам более точно идентифицировать положение медиальной линии эмбриона. Оказалось, что она локализована в регионе 3, который, таким образом, соответствует медиальной зоне СБО. Таким образом, медиальная линия СБО не соответствует срединной линии исследуемой области и смещена влево относительно нее. Тогда регионы 1 и 2 являются участками одной из латеральных зон СБО. Исходя из этого, можно предположить, что регион 3 соответствует области зародыша, где наиболее активно протекает процесс инволюции.

Выбранное время наблюдения не позволило зарегистрировать процесс возникновения и распада розетки полностью, однако инициацию распада трех розеток удалось зафиксировать (рис. 3б–3б''). В ходе распада розетки изменяется направление наибольшей протяженности образующего ее домена клеток (Blankenship et al., 2006). Поэтому ориентация клеточных границ между формирующимися при распаде розетки тяжами, может служить оценкой внутритканевой деформации. В связи с этим, мы проанализировали протяженность и ориентацию границ клеток при распаде розеток. За протяженность границ принимали длину границы между формирующимися тяжами на момент окончания съемки. Формирующиеся границы оказались сонаправлены антериопостериорной оси, отклоняясь от нее на 5.1°, 6.7° и 8.6°. Таким образом, при распаде розетки новые границы формируются практически

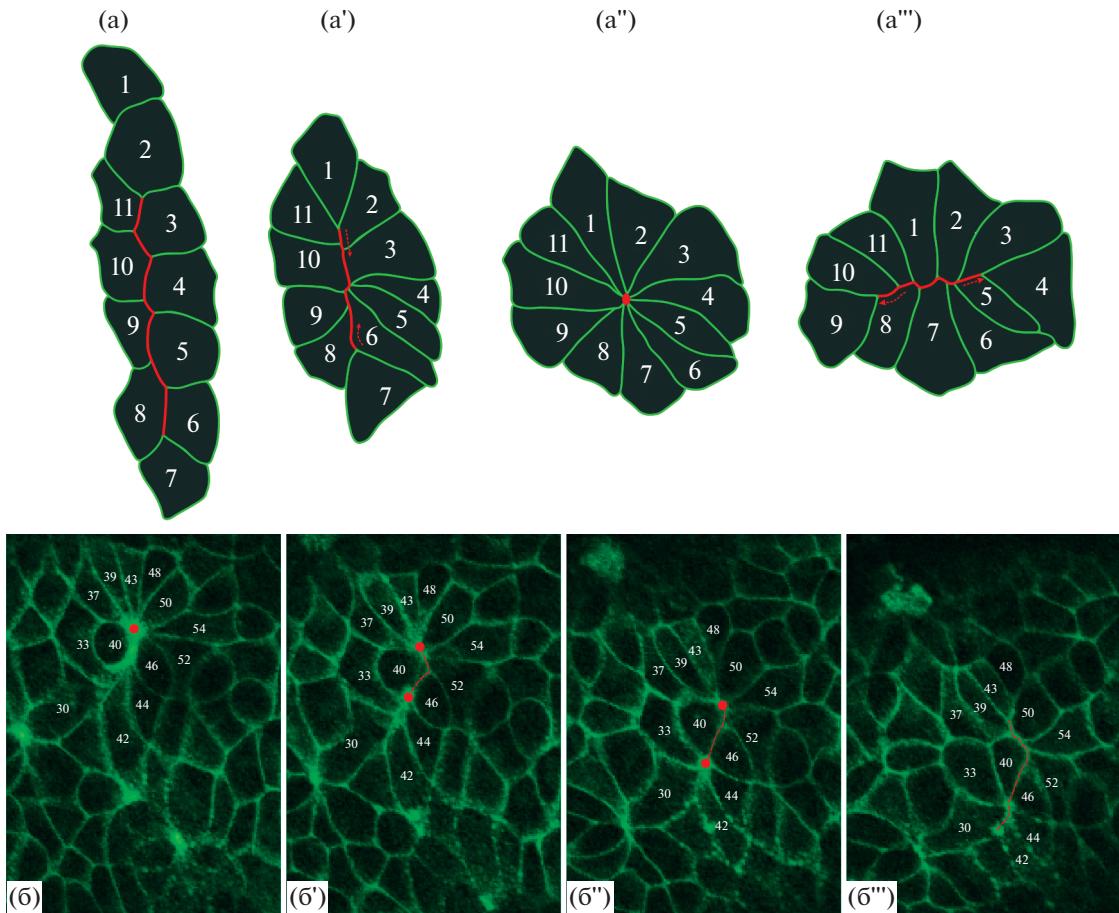


Рис. 3. (а–а'') Схема формирования и распада клеточной розетки в ходе удлинения зародышевой полоски *Drosophila melanogaster* (на основе данных, представленных в Blankenship et al., 2006). (а) Два тяжа клеток, которые впоследствии сформируют розетку. (а') При инициации формирования розетки каждая клетка внутри клеточного тяжа сокращает свою границу, которой она контактирует с клетками из соседнего тяжа. (а'') Формирование розетки заканчивается, когда граница контакта между клетками двух тяжей сходятся в точку (красная точка). (а''') В ходе распада розетки образующий домен клеток группируется в два новых тяжа, перпендикулярных ориентации первоначальных тяжей. Красная линия – граница контакта между клетками двух тяжей, пунктирные красные стрелки – направление сокращения/формирования границы между клетками двух тяжей, красная точка – центр розетки. (б–б'') Последовательные этапы распада клеточной розетки у *X. laevis*. (б) конфигурация розетки в момент начала съемки. (б'–б'') конфигурация розетки на 20-й, 40-й и 60-й минуте съемки (б', б'', и б''' соответственно). На (б', б'') можно наблюдать распад начальной розетки на две новых, после чего на б''' центры розеток исчезают. Числа в клетках (белый шрифт) обозначают порядковый номер клетки, красная точка – центр розетки, красная пунктирная линия – формирующаяся новая граница контакта между клетками розетки.

параллельно антеропостериорной оси. Согласно реконструкции карт механических напряжений, изложенной в (Belousov, 2015), формирующиеся границы также оказываются параллельны линиям напряжения внутри СБО. Это позволяет нам предположить, что наблюдаемые перестройки компенсируют усиленное растяжение поверхностного слоя клеток в ходе инволюции. В пользу этого предположения косвенно свидетельствует наибольшее значение средней скорости движений клеток в регионе 3 в первую треть наблюдения.

В дальнейшем мы планируем получить прямые доказательства того, что розетки выполняют важную роль в регулировании механической де-

формации ткани. В первую очередь, надо установить, приводит ли инволюция к усиленному растяжению материала СБО. Для этого необходимо измерить деформации ткани СБО. Затем, мы планируем провести более продолжительную цейтраферную съемку, чтобы зарегистрировать полный цикл формирования и распада розеток, а также проанализировать протяженность домена образующих розетку клеток до и после распада розетки. Цикл формирования розеток необходимо описать кинематически. Кроме того, нужно изучить лежащий в его основе клеточный механизм, так как его понимание позволит косвенно оценить распределения сил в ходе формирования розетки.

Описаны как минимум два основных типа формирования розеток, отличающихся по характеру распределения сигнальных комплексов и сократительного аппарата клетки (Harding et al., 2014). В первом случае, F-актин, миозин II и ряд белков, (ключевыми среди которых являются Раг-белки и белки клеточных контактов) локализуются в апикальном домене клетки, а процесс формирования розетки сводится к апикальному сокращению образующих ее клеток. Во втором случае актомиозиновый комплекс и сигнальные молекулы оказываются распределены вдоль взаимоперпендикулярных осей. Как правило, F-актин и миозин II локализованы на медиальных поверхностях клеток, вдоль антеропостериорной оси эмбриона, в то время как Раг-белки и белки клеточных контактов локализуются на антериорной или постериорной поверхностях клеток, вдоль медиолатеральной оси эмбриона. Кроме того, F-актин и миозин II не концентрируются в апикальном домене, а распределяются вдоль апикобазальной оси. Эти два типа розеток также отличаются временем существования. Розетки первого типа могут существовать продолжительное время, в то время как розетки второго типа быстро перестраиваются. Как правило, процессы, связанные с вытяжением ткани сопровождаются перестроением именно розеток второго типа. Поэтому, чтобы доказать высказанное нами предположение о роли обнаруженных нами розеток в деформации ткани СБО, мы планируем установить, к какому из типов принадлежат эти розетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной здесь работе мы осуществили детальное количественное описание движений клеток в эпигастеральном СБО гаструллы *X. laevis*. Мы обнаружили, что низкая скорость смещения клеток наблюдается одновременно с низкой сонаправленностью движений и, наоборот, при высокой скорости движений клеток наблюдали высокую сонаправленность их смещений. При этом, распределение скоростей и направлений смещения клеток внутри исследуемой области оказалось пространственно неоднородным. Эта неоднородность приводит к региональным различиям средней скорости и сонаправленности движений клеток вдоль медиолатеральной оси. Чтобы установить, сопровождаются ли обнаруженные региональные различия внутритканевыми деформациями, мы проанализировали динамику формы клеток в выделенных регионах. Нам не удалось выявить статистически значимых различий между формой клеток в начале и в конце наблюдения как в целом по эмбриону, так и внутри отдельных регионов. Однако анализ формы клеток позволил зафиксировать региональные различия в активности их перегруппировок. В частности, в меди-

альной зоне СБО были сконцентрированы клеточные структуры, называемые розетками. Анализ распада розеток позволил установить, что в ходе этого процесса домен клеток, образующих розетку, начинает удлиняться в направлении антеропостериорной оси. Мы предполагаем, что подобные перестройки компенсируют растяжение материала СБО в ходе процесса инволюции. Именно поэтому розетки превалируют в медиальном регионе СБО, который первым вовлекается в процесс инволюции.

Таким образом, в данной работе впервые описана пространственная неоднородность движений клеток, которая может служить потенциальным источником глобальных деформаций в СБО бесхвостых амфибий. Дальнейшее исследование этого процесса позволит изучить механизм поддержания стадиоспецифических паттернов механических сил в эмбриогенезе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору Dietmar Grasl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe) за любезно предоставленные плазмиды GAP43-GFP и H2B-mCherry, содержащие целевые последовательности флуоресцентных маркеров клеточных мембран и ядер соответственно, а также С.В. Кремневу за неоценимую помощь при синтезе РНК флуоресцентных маркеров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90191 и № 20-01-00329.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.В. Бредов разработал концепцию статьи.

И.В. Володяев, Н.Н. Лучинская и Д.В. Бредов спланировали эксперимент. Н.Н. Лучинская осуществляла получение эмбрионов и микроинъекцию флуоресцентных маркеров.

Д.В. Бредов осуществлял прижизненную цитофлуорную съемку эмбрионов.

Д.В. Бредов и Н.Н. Лучинская осуществляли анализ данных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за

животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belousov L.V. et al.* Effects of relaxation of mechanical tensions upon the early morphogenesis of *Xenopus laevis* embryos // Int. J. Dev. Biol. 1990. V. 34. № 4. P. 409–419.
- Belousov L.V.* Morphomechanics of Development. 2015. 1–195 p.
- Belousov L.V. et al.* Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // Dev. Genes Evol. 2000. V. 210. № 2. P. 92–104.
- Belousov L.V. et al.* Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // J. Embryol. Exp. Morphol. 1975. V. 34. № 3. P. 559–574.
- Bi D. et al.* Motility-driven glass and jamming transitions in biological tissues // Phys. Rev. X. 2016. V. 6. № 2.
- Blanchard G.B. et al.* Tissue tectonics: Morphogenetic strain rates, cell shape change and intercalation // Nat. Methods. 2009. V. 6. № 6. P. 458–464.
- Blankenship J.T. et al.* Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis // Dev. Cell. 2006. V. 11. № 4. P. 459–470.
- Brunet T. et al.* Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1–15.
- Butler M.T., Wallingford J.B.* Spatial and temporal analysis of PCP protein dynamics during neural tube closure // Elife. 2018. V. 7. P. 1–23.
- Campàs O. et al.* Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues // Nat. Methods. 2014. V. 11. № 2. P. 183–189.
- Campinho P. et al.* Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly // Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. № 12. P. 1405–1414.
- Chien Y.H. et al.* Mechanical strain determines the axis of planar polarity in ciliated epithelia // Curr. Biol. 2015. V. 25. № 21. P. 2774–2784.
- Davidson L.A.* Embryo Mechanics. Balancing Force Production with Elastic Resistance during Morphogenesis. Elsevier Inc., 2011. № 1. P. 215–241.
- Díz-Muñoz A. et al.* Control of directed cell migration *in vivo* by membrane-to-cortex attachment // PLoS Biol. 2010. V. 8. № 11.
- Eroshkin F.M. et al.* Development of methods and techniques to visualize mechanical tension in embryos using genetically encoded fluorescent mechanosensors // Russ. J. Dev. Biol. 2018. V. 49. № 6. P. 362–369.
- Evstifeeva A.Y., Kremnyov S.V., Belousov L.V.* Changes in topology and geometry of the embryonic epithelium of *Xenopus* during relaxation of mechanical tension // Russ. J. Dev. Biol. 2010. V. 41. P. 156–163.
- Gayrard C., Borghi N.* FRET-based molecular tension microscopy // Methods. 2016. V. 94. P. 33–42.
- Hara Y. et al.* Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation // Dev. Biol. 2013. V. 382. № 2. P. 482–495.
- Harding M.J. et al.* The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis // Dev. 2014. V. 141. № 13. P. 2549–2558.
- Heller D. et al.* EpiTools: An open-source image analysis toolkit for quantifying epithelial growth dynamics // Dev. Cell. 2016. V. 36. № 1. P. 103–116.
- Higashi T. et al.* Maintenance of the epithelial barrier and remodeling of cell-cell junctions during cytokinesis // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 14. P. 1829–1842.
- Keller R. et al.* Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2000. V. 355. № 1399. P. 897–922.
- Keller R.E.* Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behavior during and prior to gastrulation in *Xenopus laevis* // J. Morphol. 1978. V. 157. № 2. P. 223–247.
- Keller R., Sutherland A.* Convergent Extension in the Amphibian, *Xenopus laevis*. Elsevier Inc., 2020. № 1. P. 271–317.
- Kemkemer R. et al.* Cell orientation by a microgrooved substrate can be predicted by automatic control theory // Biophys. J. 2006. V. 90. № 12. P. 4701–4711.
- Ma X. et al.* Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling // Phys. Biol. 2009. V. 6. № 3.
- Mohagheghian E. et al.* Quantifying compressive forces between living cell layers and within tissues using elastic round microgels // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1.
- Mongera A. et al.* A fluid-to-solid jamming transition underlies vertebrate body axis elongation // Nature. 2018. V. 561. № 7723. P. 401–405.
- Morita H. et al.* Cell movements of the deep layer of non-neuronal ectoderm underlie complete neural tube closure in *Xenopus* // Development. 2012. V. 139. № 8. P. 1417–1426.
- Murray J.D.* Mathematical Biology Biomedical Applications., 2003. 814 p.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin) // 1967.
- Reffay M. et al.* Orientation and polarity in collectively migrating cell structures: Statics and dynamics // Biophys. J. 2011. V. 100. № 11. P. 2566–2575.
- Schaumann E.N. et al.* Force localization modes in dynamic epithelial colonies // Mol. Biol. Cell. 2018. V. 29. № 23. P. 2835–2847.
- Sive H.L. et al.* Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. CSHL Press, 2000. P. 249–297.
- Solnica-Krezel L.* Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 6. P. 213–228.
- Streicher S.J. et al.* Global morphogenetic flow is accurately predicted by the spatial distribution of myosin motors // Elife. 2018. V. 7.
- Szabó A. et al.* The molecular basis of radial intercalation during tissue spreading in early development // Dev. Cell. 2016. V. 37. № 3. P. 213–225.

- Tambe D.T. et al.* Collective cell guidance by cooperative intercellular forces // *Nat. Mater.* 2011. V. 10. № 6. P. 469–475.
- Vasilyev A. et al.* Mechanical stretch and PI3K signaling link cell migration and proliferation to coordinate epithelial tubule morphogenesis in the zebrafish pronephros // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7.
- Zamir E.A. et al.* The ECM moves during primitive streak formation – Computation of ECM versus cellular motion // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 10. P. 2163–2171.

Spatio-Temporal Dynamics of Embryonic Tissue Deformations during Gastrulation in *Xenopus laevis*: Morphometric Analysis

D. V. Bredov^{1, 2, *}, I. V. Volodyaev¹, and N. N. Luchinskaya¹

¹*Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119934 Russia*

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

*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Embryo shape changes are underlined by both local and global tissue deformations. According to the laws of classical mechanics, deformation results only from mechanical force. Thus, localization and qualitative estimation of mechanical forces can be inferred from the dynamics of strain they cause. The main cellular basis of such deformations is differences in cell migration rates. We provide a detailed description of epiectodermal cells' displacements within the dorsal marginal zone (DMZ) of the middle gastrula of *Xenopus laevis*. We detected spatial anisotropy of cell displacement rates along the mediolateral axis of the embryo and report regions within DMZ that differ in mean displacement rate. The highest means of displacement rate and co-directionality were predominantly detected in the medial region of DMZ. Cell shape analysis revealed that the medial region of DMZ is characterized by more pronounced cell rosette formation. We suggest that rosette formation acts as a mechanism that compensates stretching of the medial region of DMZ during involution.

Keywords: gastrulation, blastopore, morphogenesis, mechanical forces, cell movements, *Xenopus laevis*

ОБЗОРЫ

УДК 591.412:591.3:599.323.4

СЕРДЦЕ КРЫСЫ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

© 2021 г. В. В. Иванова^{a,*}, И. В. Мильто^{a,b}, О. Н. Серебрякова^a, И. В. Суходоло^a

^aФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Московский тракт, 2, Томск, 634050 Россия

^bФГУП Северский биофизический научный центр ФМБА России, Северск-13, а/я № 130, 636013 Россия

*e-mail: ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.02.2021 г.

После доработки 13.05.2021 г.

Принята к публикации 18.05.2021 г.

Крысы являются самыми распространенными лабораторными животными, которые используются в экспериментах по оценке кардиотоксических, в том числе тератогенных, эффектов терапевтических агентов. Для корректной интерпретации результатов экспериментальных исследований необходимо иметь детальное представление об особенностях развития и строения сердца лабораторных животных. Кардиоморфогенез крыс, в сравнении с таковым у человека, имеет следующие особенности: (1) пик пролиферативной активности кардиомиоцитов приходится на поздние этапы пренатального периода онтогенеза; (2) переход миокарда от гиперпластического типа роста к гипертрофическому происходит в раннем постнатальном периоде онтогенеза; (3) гипертрофический тип роста миокарда заключается в образовании кардиомиоцитов с несколькими диплоидными ядрами — многоядерных кардиомиоцитов.

Ключевые слова: кардиоморфогенез, онтогенез, крыса

DOI: 10.31857/S0475145021050037

ВВЕДЕНИЕ

Крысы являются самым распространенным видом лабораторных животных, которых используют в экспериментах по оценке кардиотоксических, в том числе тератогенных, эффектов терапевтических агентов (Jacob, 1999; Corstius et al., 2005; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017; Chen et al., 2019; Nefodova et al., 2019; Cohen et al., 2021). Крысы, по сравнению с другими видами лабораторных животных, имеют следующие преимущества: короткая продолжительность жизни, высокая плодовитость, относительно крупный размер, низкая частота врожденных аномалий сердца (Bradley et al., 2018). Особо стоит отметить принципиальную схожесть строения и функционирования сердца у крыс и человека: относительная масса сердца, а также относительная толщина стенки правого и левого желудочков у крыс соответствуют аналогичным параметрам сердца человека (Bryda, 2013; Buetow, Laflamme, 2018). Строение сердца полновозрелых крыс подробно описано, тогда как сведения о пренатальном и постнатальном кардиоморфогенезе крыс разрознены и противоречивы. Показано, что результаты только 37% биомедицинских исследований на лабораторных животных транслируют на человека (Hackam, Redelmeier, 2006; Ferreira et al., 2020). Для повышения эффек-

тивности исследований на животных необходимо грамотное планирование эксперимента и корректная интерпретация результатов, что невозможно без детального представления об особенностях строения органов лабораторных животных на различных этапах онтогенеза. Целью данного обзора является систематизация и анализ особенностей кардиоморфогенеза крыс.

В данном обзоре акцент сделан на кардиоморфогенез крыс линий Вистар, Спрег-Доули, а также беспородных крыс — наиболее часто используемых в экспериментах по оценке кардиотоксичности. Развитие сердца у беспородных крыс, а также крыс линий Вистар и Спрег-Доули не имеет различий. Продолжительность пренатального периода онтогенеза крыс этих линий одинакова и составляет 22–23 дня (Абрашова и др., 2013), что позволяет сопоставлять сведения о пренатальном кардиоморфогенезе крыс этих линий.

РАЗВИТИЕ СЕРДЦА КРЫСЫ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

Сердце является первым органом, формирующимся в ходе эмбриогенеза. Закладку сердца образуют клетки зародышевой мезодермы (первич-

Таблица 1. Потенции кардиогенных эмбриональных источников в развитии клеток сердца крыс (Nakagawa et al., 1993; Hildreth et al., 2008; Wessels et al., 2012; Liang et al., 2013; Чумасов и др., 2017)

| Эмбриональный источник | Участие в кардиоморфогенезе | Производные | Потенциал дифференцировки |
|--------------------------|---|--|---|
| Первичное сердечное поле | На 9 сутки пренатального периода онтогенеза формирует прямую сердечную трубку | Закладка эндокарда | <ul style="list-style-type: none"> • Фибробласты клапанов сердца • Эндотелиоциты эндокарда • Эндотелиоциты сосудов сердца |
| | | Закладка миокарда | <ul style="list-style-type: none"> • Сократительные, секреторные и проводящие кардиомиоциты |
| Вторичное сердечное поле | На 9.5 сутки пренатального периода онтогенеза преобразует прямую сердечную трубку в С-образную сердечную трубку | Закладка эндокарда | <ul style="list-style-type: none"> • Эндотелиоциты эндокарда • Фибробласты клапанов сердца • Эндотелиоциты сосудов сердца |
| | | Закладка миокарда | <ul style="list-style-type: none"> • Сократительные, секреторные и проводящие кардиомиоциты • Фибробласты перепончатой части перегородки сердца |
| | | Закладка эпикарда | <ul style="list-style-type: none"> • Мезотелий эпикарда • Фибробласты миокарда • Фибробласты клапанов сердца • Гладкие миоциты и эндотелиоциты сосудов сердца |
| Нервный гребень | На 11 сутки пренатального периода онтогенеза заселяет выходной тракт S-образной сердечной трубы | Закладка артериальных клапанов сердца, нервных узлов | <ul style="list-style-type: none"> • Проводящие кардиомиоциты • Фибробласты клапанов сердца • Эндотелиоциты и гладкие миоциты сосудов сердца • Нейроны и глиальные клетки вегетативных узлов сердца |

ное и вторичное сердечное поле) и нейроэктодермы (нервный гребень), которые в различные временные периоды вносят вклад в формирование сердца. Вклад вышеупомянутых эмбриональных источников в развитие клеток сердца обобщен в таблице (табл. 1).

Формирование прямой сердечной трубы

Первичное сердечное поле у зародыша крысы выявляется на 9 сутки пренатального периода онтогенеза в составе висцерального листка спланхнотома. Детерминация и последующая дифференцировка клеток висцерального листка спланхнотома в направлении кардиогенных клеток-предшественников происходит в результате индукционного влияния клеток энтодермы посредством фактора роста фибробластов, костных морфогенетических белков, Shh, Wnt11 и др. (Paige et al., 2015) и регулируется транскрипционными факторами Nkx2.5, Tbx5, Hand1, Hand2 и GATA4 (Takeuchi, Bruneau, 2009).

Первичное сердечное поле – это скопление клеток в форме подковы, разомкнутой частью обращенной каудально, расположенное в краинальной части зародыша крыс (Baldwin et al., 1991;

Suzuki et al., 1995). Клетки первичного сердечного поля, обращенные в целом, являются предшественниками кардиомиоцитов, тогда как клетки, прилежащие к энтодерме, являются предшественниками эндотелиоцитов (Manner, Yelbuz, 2019). Краинальная часть целома является преперикардиальной полостью. В течение суток прекардиальная мезодерма первичного сердечного поля претерпевает значительные изменения: клетки боковых отделов первичного сердечного поля перемещаются к срединной линии тела зародыша и формируют непарное продольное скопление, которое преобразуется в прямую сердечную трубку (рис. 1) (DeRuiter et al., 1992). Клетки первичного сердечного поля вносят вклад в формирование миокарда и эндокарда левого желудочка и обоих предсердий (Liang et al., 2013). Стоит отметить, что уже на стадии прямой сердечной трубы закладка сердца обладает сократительной активностью (Chacko, 1976).

Формирование С-образной сердечной трубы

Мультипотентные клетки-предшественники в составе фарингеальной мезодермы формируют парное вторичное сердечное поле, расположено-

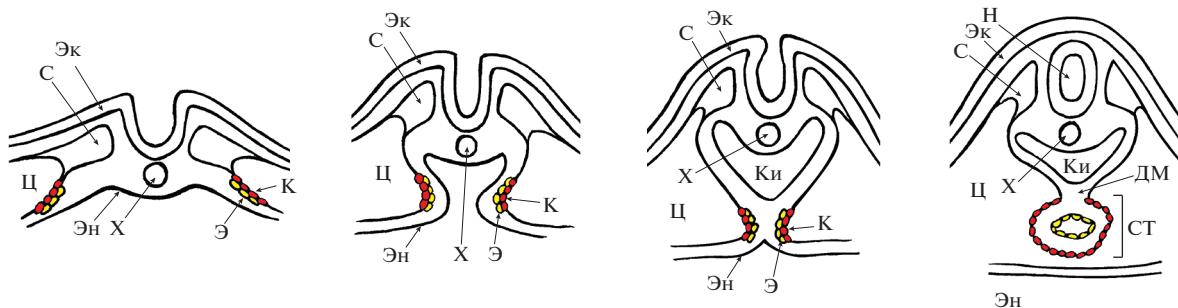


Рис. 1. Формирование закладки сердца крысы клетками висцерального листка спланхнотома. Зародышевая эктодерма (Эк), зародышевая энтодерма (Эн), зародышевый целом (Ц), хорда (Х), сомит (С), зародышевая кишка (Ки), нервная трубка (Н). Предшественники кардиомиоцитов (К), предшественники эндотелиоцитов (Э), сердечная трубка (СТ), дорсальный мезокард (ДМ). Рисунок выполнен на основе анализа снимков гистологических препаратов зародышей крыс линии Вистар (Suzuki et al., 1995).

ное медиальнее и дорсальное латеральных участков первичного сердечного поля (Ivanovitch et al., 2017). Дифференцировка клеток вторичного сердечного поля регулируется транскрипционным фактором *Isl1* (Moretti et al., 2006).

Клетки вторичного сердечного поля перемещаются к крациальному и каудальному концам прямой сердечной трубы и вносят вклад в формирование закладок миокарда предсердий, правого желудочка и выносящего тракта, а также образуют закладку эпикарда в каудальной части закладки сердца (Dodou et al., 2004). Не исключен также вклад неизвестного, отличного от вторичного сердечного поля, источника формирования закладки эпикарда. Закладка эпикарда представлена скоплением *Wt1* и *Scx*-позитивных клеток, которые являются предшественниками мезотелиоцитов, фибробластов, гладких миоцитов и эндотелиоцитов сердца.

В результате присоединения клеток вторично-го сердечного поля, прямая сердечная трубка трансформируется в С-образную сердечную трубку (Van Vliet et al., 2012). На закладке сердца крыс линии Спрег-Доули продемонстрировано, что С-образная сердечная трубка имеет справа выпуклую большую кривизну, слева — вогнутую меньшую кривизну, и бороздами разделена на отделы (рис. 2а). Каудальное положение занимает закладка предсердий, в которую впадают правый и левый рога венозного синуса. Крациальнее закладки предсердий последовательно расположены атрио-вентрикулярный отдел, закладка левого желудочка и закладка правого желудочка. Самое краильное положение в С-образной сердечной трубке занимает артериальный конус (Marcela et al., 2012). Закладка сердца сохраняет связь с висцеральным листком спланхнотома посредством дорсального мезокарда. Между закладкой миокарда и закладкой эндокарда в составе прямой и С-образной сердечной трубы определяется сердечное же-ле (Козлов и др., 1995; Sedmera, McQuinn, 2008) —

бесклеточный гелеобразный слой, содержащий тонкие переплетающиеся радиально направленные филаменты, прикрепляющиеся к базальным мембранам закладки миокарда и закладки эндокарда. Сердечное же-ле обеспечивает односторонний ток крови в трубчатом сердце (Manner, Yelbuz, 2019).

Формирование S-образной сердечной трубы

На 10 сут пренатального периода онтогенеза крыс происходит формирование петли закладки сердца, в результате чего она принимает вид S-образной трубы. Закладки предсердий смещаются дорсально и краильно, исчезает дорсальный мезокард, на вентральной стенке рогов венозного синуса определяются проэпикардиальные выпячивания (Marcela et al., 2012). Нокаут генов транскрипционных факторов *Nkx2.5*, *MEF-2*, *Hand-1* и *Hand-2* блокирует развитие сердца на стадии формирования петли (Van Vliet et al., 2012). Венозный синус и закладка предсердий у крыс в период формирования петли образованы слоем миокарда и эндокарда, между которыми практически отсутствует сердечное же-ле. Закладки миокарда и эндокарда атрио-вентрикулярного отдела, закладки желудочек и артериального конуса разделены выраженным слоем сердечного же-ле (Manner, Yelbuz, 2019). Образование петли сердца сопровождается увеличением частоты сокращений закладки сердца (Chacko, 1976). Начиная с 11 сут пренатального периода онтогенеза, сокращения закладки сердца являются ритмичными и эффективными.

Появление перегородок в закладке сердца и трабекуляция миокарда

На 11 сут пренатального периода онтогенеза в трубчатой закладке сердца у крыс формируются первичное межпредсердное отверстие, первичное

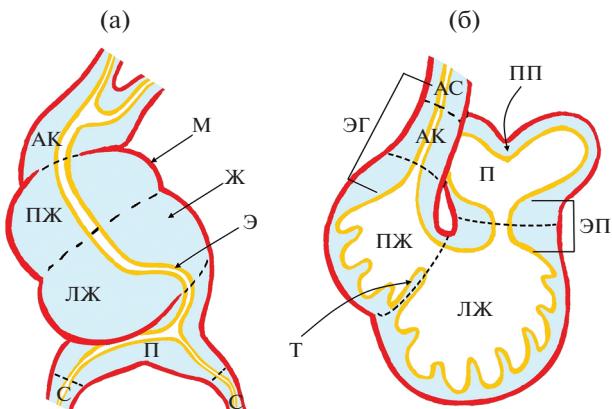


Рис. 2. Формирование петли (а) и перегородок (б) в закладке сердца крысы. Венозный синус (С), закладка предсердий (П), закладка левого желудочка (ЛЖ), закладка правого желудочка (ПЖ), артериальный конус (АК), артериальный ствол (АС). Закладка миокарда (М), закладка эндокарда (Э), сердечное желе (Ж). Атрио-вентрикулярные эндокардиальные подушки (ЭП), эндокардиальные гребни аортального конуса (ЭГ), первичная предсердная перегородка (ПП), трабекулы закладки миокарда желудочков (Т). Рисунок выполнен на основе анализа сканирующих электронограмм и гистологических препаратов закладки сердца крыс линии Спрег-Доули (Marcela et al., 2012).

межжелудочковое отверстие и закладка атрио-вентрикулярных клапанов (рис. 2б). Край первичной предсердной перегородки и атрио-вентрикулярные эндокардиальные подушки ограничивают первичное межпредсердное отверстие (Rogers, Morse, 1986). Первичное межжелудочковое отверстие у крыс ограничено атрио-вентрикулярными эндокардиальными подушками и некоторыми трабекулами закладок миокарда желудочков (Marcela et al., 2012).

Первичная предсердная перегородка следует от дорсо-краиальной стенки закладки предсердий вентрально-каудально (Rogers, Morse, 1986). Закладка первичной предсердной перегородки появляется в виде мышечного гребня стенки закладки предсердий, в области растущего края которого позднее появляется мезенхимный колпачок (Anderson et al., 2002). В формировании мезенхимного колпачка принимают участие эндотелиоциты, которые продуцируют компоненты межклеточного вещества и, претерпевая эпителио-мезенхимный переход, формируют мезенхимные клетки растущей первичной предсердной перегородки (Deepe et al., 2020).

Эндотелиоциты атрио-вентрикулярного отдела также претерпевают эпителио-мезенхимный переход и мигрируют в подлежащее сердечное желе, в результате чего формируются дорсальная и вентральная атрио-вентрикулярные эндокардиальные подушки (Manner, Yelbuz, 2019), которые являются первичными клапанами закладки сердца. Эпи-

телио-мезенхимному переходу эндотелиоцитов способствуют трансформирующий фактор роста β , Notch1 и Wnt/ β -катенин (Combs, Yutzey, 2009).

На 11 сут пренатального периода онтогенеза у крыс наблюдается трабекуляция миокарда желудочков (Marcela et al., 2012). Инвагинации закладки эндокарда погружаются в сердечное желе и достигают закладки миокарда, после чего под индукционным влиянием клеток закладки эндокарда, начинается перемещение предшественников кардиомиоцитов в сердечное желе (Manner, Yelbuz, 2019). В результате в закладках желудочков сердца крысы появляются рыхло расположенные миокардиальные трабекулы, выстланные закладкой эндокарда, а сердечное желе начинает редуцироваться. Показано, что взаимодействие предшественников эндотелиоцитов и предшественников кардиомиоцитов в ходе трабекуляции опосредуется Notch (Grego-Bessa et al., 2007). Деградация сердечного желе регулируется металлопротеиназой Adamts1, экспрессия которой клетками эндокарда находится под контролем Brg1 (Stankunas et al., 2008).

На 12 сут пренатального периода онтогенеза закладка сердца снаружи покрыта закладкой эпикарда. Клетки закладки эпикарда начинают погружаться в закладку миокарда и стromу атрио-вентрикулярных эндокардиальных подушек (эпителио-мезенхимный переход), причем вклад клеток эпикардиального происхождения в формирование разных створок клапанов сердца различен (Wessels et al., 2012).

На 13 сут пренатального периода онтогенеза у зародыша крысы в вентрально-краиальной части первичной предсердной перегородки появляется вторичное межпредсердное отверстие в виде множественных перфораций, которые затем объединяются (Morse et al., 1984). Межжелудочковая перегородка объединяется с атрио-вентрикулярными эндокардиальными подушками, оба желудочка сообщаются с артериальным конусом первичным межжелудочковым отверстием (Marcela et al., 2012).

Появление артериального ствола в закладке сердца

Изучение кардиоморфогенеза крыс линии Спрег-Доули показало, что в закладке сердца на 11 сут пренатального периода онтогенеза появляется дистальный отдел выносящего тракта – артериальный ствол, образованный мезенхимой, выстланной предшественниками эндотелиоцитов (Marcela et al., 2012).

В области аортального конуса в сердечное желе погружаются мезенхимные клетки эндокардиального происхождения – формируются синистро-вентральный и дексстра-дорсальный эндокардиальные гребни аортального конуса, служащие заклад-

ками артериальных клапанов сердца (Manner, Yel-buz, 2019).

Мезенхима нервного гребня участвует в образовании перегородки выносящего тракта сердца, а также дает начало клеткам вегетативных узлов сердца (Hildreth et al., 2008). Клетки нервного гребня, которые вносят вклад в формирование закладки сердца, экспрессируют Wnt1, Pax3 и Sox10 (Witman et al., 2020). Мезенхима артериального ствола и нервного гребня вносят вклад в формирование стенки крупных артерий, артериальных клапанов и фиброзного скелета сердца (Chan et al., 2004).

На 13 сут пренатального периода онтогенеза у зародыша крысы артериальный ствол трансформируется в заслонки артериальных клапанов (Marcela et al., 2012).

Компактизация миокарда

В закладках желудочков сердца крысы на 13 сут пренатального периода онтогенеза прогрессивно снижается объем сердечного желе, предшественники кардиомиоцитов устанавливают контакты друг с другом и со структурами закладки эндокарда. Помимо внутреннего трабекулярного слоя миокарда, в закладке сердца появляется наружный компактный слой миокарда (Козлов и др., 1995). Для обеспечения достаточного питания в утолщающемся миокарде желудочков зародышей крыс в результате васкуло- и ангиогенеза появляются кровеносные сосуды (Ratajska et al., 2003). В формировании сосудов сердца принимают участие клетки эпикардиального, эндокардиального и нейроэктодермального генеза (Chan et al., 2004; Чумасов и др., 2017).

Завершение формирования перегородок в закладке сердца

На 14 сут пренатального периода онтогенеза в сердце зародыша крысы в результате объединения дорсальной и вентральной атрио-вентрикулярных эндокардиальных подушек появляется атрио-вентрикулярная перегородка. У зародышей крыс линий Вистар (Wenink et al., 1996) и Спрег-Доули (Marcela et al., 2012) в закладке сердца на 14 сут пренатального периода онтогенеза начинают формироваться створки атрио-вентрикулярных клапанов, сухожильные нити и сосочковые мышцы. Вторичное межжелудочковое отверстие ограничено межжелудочковой перегородкой, правыми бугорками атрио-вентрикулярных эндокардиальных подушек и синистро-вентральным гребнем артериального конуса.

На 15 сут пренатального периода онтогенеза у зародыша крысы справа от первичной межпредсердной перегородки формируется вторичная межпредсердная перегородка и овальное отвер-

стие (Rogers, Morse, 1986). Происходит окончательное разделение выносящего тракта сердца, вторичное межжелудочковое отверстие уменьшается, но сохраняется. Межжелудочковое отверстие закрывается на 16 сут пренатального периода онтогенеза крыс.

Заключительные этапы пренатального морфогенеза сердца

На 16 сут пренатального периода онтогенеза сердце зародыша крысы анатомически сформировано. Межжелудочковая перегородка представлена апикальной (трабекулярной, мышечной), средней и базальной (гладкие и компактные, перепончатые) зонами. У плодов крыс линии Вистар определяются все структуры проводящей системы сердца (van Kempen et al., 1991). Толщина стенки желудочков закладки сердца крысы на 18 сут пренатального периода онтогенеза в несколько раз превышает толщину стенки предсердий (рис. 3а). Продолжается утолщение стенки желудочков, преимущественно, за счет компактного слоя миокарда (Козлов и др., 1995). Толщина сосудистого сплетения, покрывающего закладку миокарда, возрастает, крупные вены и артерии сердца постепенно удлиняются, ветви кровеносных сосудов проникают вглубь миокарда (Ratajska et al., 2003). У крыс на 20–21 сут пренатального периода онтогенеза локализация артерий и вен сердца аналогична таковой у половозрелых крыс (Ratajska et al., 2003).

Пик пролиферативной активности кардиомиоцитов крыс приходится на 18 сут пренатального периода онтогенеза (Загоруйко и др., 2019). Изучение пренатального развития сердца у плодов крыс линий Спрег-Доули (Bishop et al., 1990) и Вистар (Загоруйко и др., 2019) свидетельствует о том, что на 17–20 сут пренатального периода онтогенеза наблюдается значительное увеличение размеров сердца (табл. 2). Общий объем сердца крыс линии Спрег-Доули увеличивается с 2.9 мм³ на 15 сут пренатального периода онтогенеза до 33.2 мм³ на 22 сут пренатального периода онтогенеза (Markel et al., 2020). Стоит отметить, что авторы зачастую не дают подробного описания методики препаровки сердца перед измерением, что может быть причиной различий морфометрических показателей сердца крыс, полученных разными исследовательскими группами.

Преобразование эндокарда закладки сердца крыс

Закладка эндокарда отличима от закладки миокарда уже на стадии прямой сердечной трубки как по локализации, так и по экспрессии клетками специфических маркеров, таких как CD31, VE-кадгерин, VEGFR2 (Drake, Fleming, 2000). Исследование закладок сердца зародышей крыс линии Вистар показало, что закладка эндокарда у

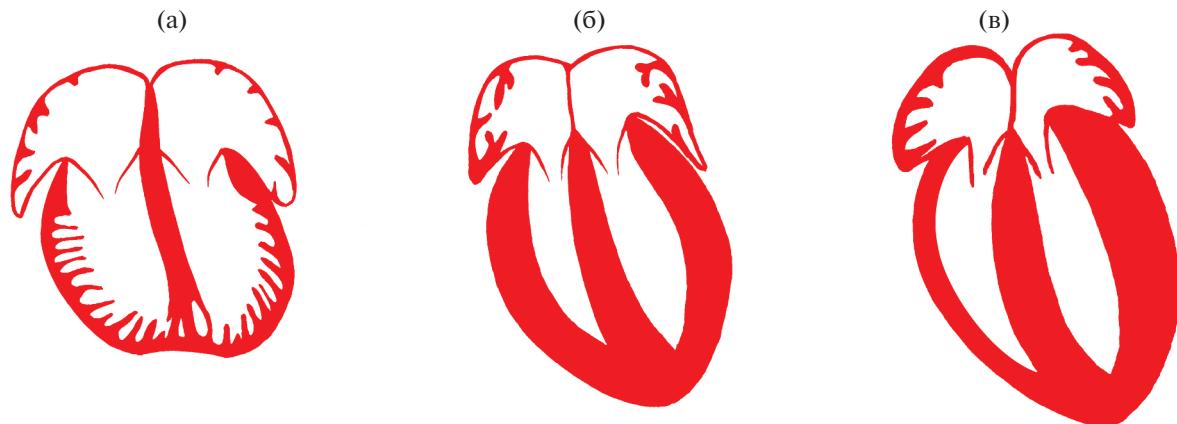


Рис. 3. Сравнительная морфология сердца крысы в различные периоды онтогенеза. Сердце крысы на 19 сутки пренатального периода онтогенеза (а), 1 сут постнатального периода онтогенеза (б) и 7 сут постнатального периода онтогенеза (в). Рисунок выполнен на основе результатов изучения гистологических препаратов сердца плодов крыс, новорожденных крыс и крыс-сосунов линии Вистар (собственные наблюдения авторов).

крысы во всех отделах прямой и С-образной сердечной трубки имеет одинаковое строение. Клетки закладки эндокарда плотно прилежат друг к другу, вдаются в просвет сердечной трубки, придавая эндокарду вид булыжной мостовой. Клетки закладки эндокарда содержат сферическое крупное ядро с преобладанием эухроматина и 1–2 ядрышками, а также выраженный белок-синтетический аппарат (Markwald et al., 1975).

Различия в строении клеток закладки эндокарда появляются с началом септации закладки сердца и зависят от локализации клеток. Клетки закладки эндокарда предсердий и желудочков постепенно уплощаются, в дальнейшем их структура практически не изменяется. Уплощенные клетки, выстилающие полости предсердий и желудочков, являются предшественниками эндотелиоцитов эндокарда.

Напротив, клетки закладки эндокарда, выстилающие атрио-вентрикулярный отдел и артериальный конус, приобретают оvoidную форму, некоторые из них имеют направленные в сердечное желе филоподии, а в их цитоплазме развит гранулярный эндоплазматический ретикулум и пластинчатый комплекс (Markwald et al., 1975). Часть клеток закладки эндокарда, выстилающих атрио-

вентрикулярный отдел и артериальный конус, погружается в сердечное желе и участвует в формировании стромы атрио-вентрикулярных эндокардиальных подушек и эндокардиальных гребней артериального конуса (Manner, Yelbuz, 2019). Не погружающиеся в сердечное желе клетки закладки эндокарда атрио-вентрикулярных эндокардиальных подушек и эндокардиальных гребней аортального конуса постепенно уплощаются, и, начиная с 13 сут пренатального периода онтогенеза, не отличаются от эндотелиоцитов эндокарда предсердий и желудочек (Markwald et al., 1975). Уплощенные клетки, выстилающие атрио-вентрикулярные эндокардиальные подушки и эндокардиальные гребни аортального конуса, являются предшественниками эндотелиоцитов клапанов сердца.

Преобразование миокарда закладки сердца крыс

Предшественники кардиомиоцитов в закладке сердца идентифицируются, начиная с 9.5 сут пренатального периода онтогенеза, по экспрессии α -SMA, α и β тяжелых цепей миозина (Ya et al., 1997). На 9.5 сут пренатального периода онтоге-

Таблица 2. Динамика морфометрических показателей сердца плодов крыс на примере крыс линии Вистар (Clark, 1973; Ito et al., 1998, 2001)

| Срок пренатального периода онтогенеза, сутки | Масса сердца, мг | Толщина стенки левого желудочка, мм | Площадь митрального клапана, мм^2 | Площадь аортального клапана, мм^2 |
|--|------------------|-------------------------------------|--|--|
| 16 | 2.7 | — | — | — |
| 18 | 4.0 | 0.35 | 0.26 | 0.05 |
| 20 | 11.7 | 0.45 | 0.28 | 0.12 |
| 22 | 25.9 | 0.50 | 0.50 | 0.26 |

неза в закладке миокарда крыс линии Спрег-Доули впервые выявляются диффузно расположенные ННК-1-позитивные клетки, представляющие собой предшественники проводящих кардиомиоцитов (Nakagawa et al., 1993). На 12 сут пренатального периода онтогенеза в закладке сердца крыс выявляются диффузно расположенные секреторные кардиомиоциты, содержащие предсердный натрийуретический пептид (Navaratnam et al., 1989).

На стадии прямой и С-образной сердечной трубки закладки миокарда предсердий и желудочков крыс морфологически неотличимы и состоят из 1–2 слоев рыхло расположенных предшественников кардиомиоцитов. Это одноядерные клетки, обеспечивающие сердцебиение: в их цитоплазме обнаружаются отдельные короткие неупорядоченные миофибриллы. Митохондрии в предшественниках кардиомиоцитов имеют незначительное количество крист, канальцы агранулярного эндоплазматического ретикулума практически не выявляются (Козлов и др., 1995). Начиная с 10 сут пренатального периода онтогенеза, на предшественниках кардиомиоцитов крыс линии Спрег-Доули выявляется коннексин 43. Коннексины диффузно распределены в плазмолемме кардиомиоцитов, их количество прогрессивно увеличивается в ходе пренатального периода онтогенеза (Gourdie et al., 1992).

Закладки миокарда предсердий и миокарда желудочков у эмбрионов крыс начинают отличаться на 11 сут пренатального периода онтогенеза, с началом трабекуляции миокарда желудочков. Ядра предшественников кардиомиоцитов на этой стадии светлые, с крупным ядрышком, а в их цитоплазме определяются полисомы и трофические включения. Миофибриллы увеличиваются в длину и ориентированы под углом друг к другу на перipherии цитоплазмы кардиомиоцита (Bishop et al., 1990; Козлов и др., 1995). Предшественники проводящих кардиомиоцитов предсердно-желудочкового пучка определяются вдоль вентрикулярных миокардиальных трабекул, формирующих первичную межжелудочковую перегородку (Nakagawa et al., 1993; Liang et al., 2013).

Показано, что закладка миокарда предсердий у крыс линии Вистар на 12 сут пренатального периода онтогенеза состоит из 4–8 слоев рыхло расположенных сферических предшественников кардиомиоцитов, тогда как закладка миокарда желудочков состоит из 8–10 слоев округлых или овальных предшественников кардиомиоцитов, формирующих трабекулярную сеть (Seki et al., 2003). Впервые в некоторых предшественниках кардиомиоцитов появляются секреторные везикулы, содержащие предсердный натрийуретический пептид. Секреторные кардиомиоциты диффузно расположены в миокарде закладки сердца

(Navaratnam et al., 1989). В закладке сердца у зародышей крыс линии Спрег-Доули на 12,5 сут пренатального периода онтогенеза определяются правая и левая ножки предсердно-желудочкового пучка. Клетки нервного гребня образуют закладку синусно-предсердного узла (Nakagawa et al., 1993).

На 13 сут пренатального периода онтогенеза в закладке миокарда желудочек различают темные и светлые предшественники кардиомиоцитов (Козлов и др., 1995). Светлые предшественники кардиомиоцитов активно сокращаются и пролиферируют (Загоруйко, Загоруйко, 2017). Темные предшественники кардиомиоцитов являются функциональным резервом, активирующимся к рождению крысы. Изучение популяций предшественников кардиомиоцитов у зародышей крыс Вистар показало, что темные и светлые предшественники кардиомиоцитов способны к взаимному превращению (Загоруйко, Загоруйко, 2018). Светлые и темные предшественники кардиомиоцитов обладают различной чувствительностью к действию повреждающих факторов (Ямщикова, 2004).

На 14 сут пренатального периода онтогенеза предшественники секреторных кардиомиоцитов определяются в предсердиях и в желудочках, их ультраструктура свидетельствует о высокой синтетической активности (Shevchenko, 2019). В единительной ткани закладки миокарда определяются низкодифференцированные фибробласты и пучки коллагеновых волокон (Загоруйко, Загоруйко, 2018).

На 18 сут пренатального периода онтогенеза миокард предсердий плодов крыс образован 2–3 слоями кардиомиоцитов. В их цитоплазме определяются пучки миофибрилл, митохондрии, синтетический аппарат.

Миокард желудочков крыс представлен тремя разнонаправленными слоями кардиомиоцитов (Козлов и др., 1995). Кардиомиоциты желудочков крыс на данном сроке имеют вытянутую форму (Seki et al., 2003) и плотно прилежат друг к другу, миофибриллы в них занимают значительный объем цитоплазмы, однако расположены неупорядоченно, саркомеры имеют типичную ультраструктуру (Wenink et al., 1996). Митохондрии в предшественниках кардиомиоцитов преимущественно локализованы перинуклеарно (Козлов и др., 1995). У плодов крыс линии Спрег-Доули накопление секреторных везикул в секреторных кардиомиоцитах желудочков крыс происходит до конца пренатального периода онтогенеза, однако, их количество гораздо меньше, чем в кардиомиоцитах предсердий (Lam et al., 2002). Наибольшее количество секреторных везикул с предсердным натрийуретическим пептидом показано в кардиомиоцитах внутреннего слоя миокарда ушек предсердий. В желудочках секреторные везикулы с предсердным натрийуретическим пептидом опре-

деляются в субэндокардиально расположенных кардиомиоцитах межжелудочковой перегородки и в основании сосочковых мышц (Thompson et al., 1989).

Начиная с 20 сут пренатального периода онтогенеза, в миокарде крыс определяются единичные двуядерные кардиомиоциты (Загоруйко, Загоруйко, 2017).

Таким образом, дифференцировка предшественников кардиомиоцитов в ходе пренатального периода онтогенеза заключается в увеличении в них количества органелл, уменьшении удельного объема трофических включений и усложнении организации клеточных контактов.

Кардиомиоциты крыс в пренатальном периоде онтогенеза имеют метаболические особенности: основным энергетическим субстратом кардиомиоцитов является глюкоза, что объясняет высокую активность гликогенитических ферментов в них в этот период. К моменту рождения активность гексокиназы в кардиомиоцитах снижается, тогда как активность α -глицерофосфатдегидрогеназы, АТФазы, цитратсинтазы, сукцинатдегидрогеназы, митохондриальной и цитоплазматической креатинкиназы, напротив, возрастает. Показано, что у плодов крыс линий Спрег-Доули и Вистар в предшественниках кардиомиоцитов экспрессируются β -МНС (β -myosin heavy chain – β -тяжелая цепь миозина) и ssTnI (slow skeletal muscle troponin I – тропонин I медленных скелетных мышц) (Andrés et al., 1984; Lam et al., 2002). Выраженное изменение электрофизиологических свойств кардиомиоцитов предсердий и желудочков крыс наблюдается после 19 суток пренатального периода онтогенеза (Couch et al., 1969). Экспрессия $\text{Na}^+,\text{Ca}^{2+}$ -обменника возрастает в ходе эмбриогенеза, достигая максимальных значений на 18 сут пренатального периода онтогенеза крыс (Koban et al., 1998). Напротив, экспрессия Ca^{2+} -АТФазы мембранны саркоплазматического ретикулума у плодов крыс снижена, по сравнению с новорожденными и половозрелыми крысами (Ribadeau-Dumas et al., 1999).

Структурные и метаболические преобразования кардиомиоцитов в ходе пренатального периода онтогенеза приводят к улучшению сократительной функции миокарда.

Преобразование эпикарда закладки сердца крыс

Изучение сердец эмбрионов крыс линии Спрег-Доули показало, что к 13.5 сут пренатального периода развития закладка эпикарда полностью покрывает закладку сердца. Закладка эпикарда образована эпителиальными клетками и подлежащим слоем межклеточного вещества. На 13.5 сут пренатального периода онтогенеза большинство эпителиоцитов, образующие закладку

эпикарда, имеют уплощенную форму с небольшим количеством микроворсинок на апикальном полюсе. Также в составе закладки эпикарда, главным образом, в области атрио-вентрикулярной перегородки, определяются сферические клетки. В области атрио-вентрикулярной перегородки сердца клетки закладки эпикарда претерпевают эпителио-мезенхимный переход и мигрируют в субэпикардиальный слой (Nesbitt et al., 2006). Изучение пренатального кардиоморфогенеза крыс линии Вистар показало, что клетки закладки эпикарда дают начало фибробластам соединительной ткани сердца и гладким миоцитам стенки кровеносных сосудов сердца (Чумасов и др., 2017). Клетки закладки эпикарда, покрывающие сердце снаружи, являются предшественниками мезотелиоцитов эпикарда.

РАЗВИТИЕ СЕРДЦА КРЫСЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

Переход от пренатального развития к жизни вне утробы матери сопровождается сменой плацентарного газообмена легочным. Функциональное закрытие артериального протока у крыс происходит в первые часы, венозного протока – на 2 день, овального отверстия – на 3 день постнатального периода онтогенеза (Greeley, White-Hunt, 2016). Структурное и функциональное созревание сердца продолжаются у крыс до периода половой зрелости. Структурные перестройки сердца половозрелых крыс связаны, в основном, с продолжающимся ростом животных и увеличением гемодинамической нагрузки на сердце. Кроме того, известен модулирующий эффект половых гормонов на морфо-функциональное состояние сердца (Forman et al., 1997).

Строение сердца неполовозрелых крыс

К рождению крысы толщина стенки предсердий значительно меньше, чем желудочков. Толщина стенок левого желудочка, правого желудочка и межжелудочковой перегородки примерно одинакова (рис. 3б). С изменением гемодинамических условий после рождения, нагрузка на сердце возрастает, что приводит к интенсивному росту миокарда (табл. 3), главным образом, левого желудочка (рис. 3в) (Anversa et al., 1980). Однако, в первые сутки постнатального периода онтогенеза масса крыс и их сердца не только не возрастает, но и может несколько снижаться. Предсочный период у крыс, соответствующий первым 6 ч после рождения, характеризуется адаптацией животного к новым условиям существования (прекращение плацентарного питания, высокое парциальное давление кислорода во вдыхаемом воздухе, непостоянная температура окружающей среды) и

Таблица 3. Динамика морфометрических показателей сердца крыс в постнатальном периоде развития на примере крыс линии Спрег Доули (Harmon et al., 1986; Jurado et al., 2013; Piao et al., 2013; Gear et al., 2017; Xue et al., 2019)

| Срок постнатального периода онтогенеза, сутки | Отношение массы сердца к массе тела, мг/г | | Масса сердца, мг | | Толщина стенки левого желудочка, мм | |
|---|---|-------|------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки |
| 2 | | 7.1 | | 61 | | — |
| 7 | | 6.0 | | 71.2 | | — |
| 15 | | 5.7 | | 135.0 | | — |
| 21 | | 4.8 | | 300 | | 1.85 |
| 90 | 3.3 | 3.6 | 1440 | 990 | 2.57 | 2.50 |
| 180 | 2.8 | 3.1 | 1620 | 1100 | 2.60 | 2.30 |

длится до начала питания материнским молоком. Таким образом, крысы в первые часы постнатального периода онтогенеза не получают питательных веществ, с чем связывают наблюдаемую, в том числе в кардиомиоцитах, активацию процессов аутофагии (Ošt'ádalová, Babický, 2012).

С момента рождения до 8 сут постнатального периода онтогенеза масса правого желудочка по отношению к массе тела практически не изменяется, тогда как масса левого желудочка по отношению к массе тела после рождения прогрессивно увеличивается. К концу первой недели постнатального периода онтогенеза у крыс линий Вистар (Anversa et al., 1980) и Спрег-Доули (Greeley, White-Hunt, 2016) толщина стенки левого желудочка сердца у крыс превышает толщину стенки правого желудочка в три раза. Площадь створок и заслонок клапанов увеличивается соответственно росту сердца (Greeley, White-Hunt, 2016).

Преобразование эндокарда неполовозрелых крыс

Клапаны сердца новорожденных крыс образованы тонким слоем базофильного межклеточного матрикса, в который погружено множество низко-дифференцированных клеток. Клапаны выстланы одним слоем эндотелиоцитов. Эндотелиоциты, выстилающие камеры сердца, являются функционально незрелыми клетками (Чумасов и др., 2018).

С 14 сут постнатального периода онтогенеза у крыс клеточность соединительнотканной основы клапанов сердца прогрессивно уменьшается, а плотность коллагеновых и эластических волокон – увеличивается (Greeley, White-Hunt, 2016). Структурное развитие клапанов сердца у крыс завершается к 35 дню постнатального периода онтогенеза.

Преобразование миокарда неполовозрелых крыс

В миокарде крыс на 1 сут постнатального периода онтогенеза численно преобладающей по-

пуляцией клеток являются кардиомиоциты (62% от всех клеток) (Vanegjee et al., 2007). Среди них доля темных кардиомиоцитов составляет 41%, однако в течение первой недели постнатального периода онтогенеза их количество стремительно уменьшается за счет перехода от физиологического покоя к сократительной активности (Загоруйко, Загоруйко, 2017). Отдельные кардиомиоциты желудочков крыс в пренатальном и неонатальном периодах онтогенеза имеют первичную ресничку. Вероятно, первичная ресничка имеет значение в регуляции кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов исключительно на этапе развития сердца (Kaur et al., 2018). На 11 сут постнатального периода онтогенеза кардиомиоциты правого и левого желудочков у крыс линии Вистар морфологически не различимы, также отсутствуют различия в организации субэндокардиальных и субэпикардиальных участков миокарда желудочков (Olivetti et al., 1980). В миокарде предсердий и желудочков новорожденных крыс активно протекает ангиогенез (Чумасов и др., 2018).

Быстрое увеличение массы миокарда у крыс наблюдается с 1 по 14 сут постнатального периода онтогенеза, после чего процесс продолжается медленнее до 42 сут (Greeley, White-Hunt, 2016). В постнатальном периоде онтогенеза увеличение массы миокарда у крыс происходит по гиперпластическому и гипертрофическому типам (Clubbs, Bishop, 1984; Li et al., 1996).

Гиперпластический тип роста миокарда у крыс наблюдается на 1–3 сут постнатального периода онтогенеза и заключается в увеличении количества кардиомиоцитов в результате их деления. Количество кардиомиоцитов в течение первых трех дней постнатального периода онтогенеза у крыс линии Спрег-Доули увеличивается на 68% и после остается постоянным (Li et al., 1996). Миокард в этот период образован одноядерными кардиомиоцитами с центральным расположением ядра, перинуклеарной локализацией митохондрий и субплазмолеммальным расположением миофиб-

рилл (Bishop et al., 1990; Иванченко, Твердохлеб, 2014). Размер кардиомиоцитов, а также удельный объем митохондрий и миофибрилл в их цитоплазме превышает аналогичные показатели кардиомиоцитов плодов крыс. Миофибриллы расположены более упорядоченно вдоль длинной оси кардиомиоцитов. С 1 по 3 сут постнатального периода онтогенеза у крыс значительно увеличивается количество нексусов и десмосом между кардиомиоцитами (Козлов и др., 1995). Нексусы не имеют четкой локализации, а диффузно расположены в плазмолемме кардиомиоцитов (Gourdie et al., 1992). В кардиомиоцитах предсердий количество секреторных везикул с предсердным натрийуретическим пептидом ниже, чем в поздний плодный период, в кардиомиоцитах желудочек они не определяются (Navaratnam et al., 1989). Показано увеличение содержания предсердного натрийуретического пептида в секреторных кардиомиоцитах предсердий крыс линии Спрег-Доули с 3 по 21 сут постнатального периода онтогенеза (Wei et al., 1987).

Гипертрофический тип роста миокарда у крыс наблюдается, начиная с 4 сут постнатального периода онтогенеза. Кардиомиоциты крыс теряют способность завершать цитокинез на 3–4 сут после рождения животного: полноценные митозы сменяются эндомитозом, в результате которого образуются двуядерные кардиомиоциты (Clubb, Bishop, 1984; Li et al., 1997). Показано, что к 12 сут постнатального периода онтогенеза у крыс линии Спрег-Доули доля двуядерных кардиомиоцитов достигает 90% (Li et al., 1996). После 15 сут постнатального периода онтогенеза у крыс линии Вистар общее количество кардиомиоцитов и доля двуядерных кардиомиоцитов остаются постоянными (Загоруйко и др., 2019).

Кардиомиоциты желудочек крыс на 6–12 сут постнатального периода онтогенеза представляют собой клетки вытянутой формы, содержащие одно или два центрально расположенных ядра. В цитоплазме кардиомиоцитов крыс линии Спрег-Доули миофибриллы занимают периферическое положение, многочисленные митохондрии – центральное (Bishop et al., 1990). На кардиомиоцитах беспородных крыс показано постепенное увеличение количества межмиофибриллярных митохондрий (Иванченко, Твердохлеб, 2014). На 6–9 сут постнатального периода онтогенеза в кардиомиоцитах крыс впервые визуализируются короткие Т-трубочки. К 14–15 сут постнатального периода онтогенеза в кардиомиоцитах крыс линии Вистар значительно усложняется система Т-трубочек, которые проникают вглубь цитоплазмы (Seki et al., 2003). Поперечная исчерченность саркоплазмы кардиомиоцитов крыс полностью формируется к 21 сут после рождения. К этому же времени удельный объем митохондрий достигает величины, характерной для кардио-

миоцитов взрослых крыс (Козлов и др., 1995). Изоформы ферментов и их активность в кардиомиоцитах крыс линий Вистар и Спрег-Доули на 21 сут после рождения аналогичны таковым у взрослых крыс (Andrés et al., 1984; L'Ecuyer et al., 1991; Lam et al., 2002). Экспрессия коннексина 43 сократительными кардиомиоцитами крыс линии Спрег-Доули достигает максимума к 21 сут постнатального периода онтогенеза, после чего наблюдается трехкратное снижение данного показателя к 45 сут постнатального периода онтогенеза (Gourdie et al., 1992). Изменение экспрессии коннексина 43 сопряжено с перераспределением нексусов в плазмолемме сократительных кардиомиоцитов и формированием вставочных дисков в постнатальном периоде онтогенеза (van Kempen et al., 1991; Gourdie et al., 1992).

Исследования сердца крыс линий Спрег-Доули и Вистар показали, что на 28 сут постнатального периода онтогенеза кардиомиоциты отличаются от таковых у половозрелых крыс только меньшими размерами. Ядра кардиомиоцитов в этот срок занимают центральное положение, миофибриллы равномерно распределены в цитоплазме, митохондрии располагаются вдоль саркомеров, Т-трубочки представляют собой сложную развитую систему (Bishop et al., 1990; Seki et al., 2003). Гипертрофия кардиомиоцитов у крыс с 28 по 42 сут постнатального периода онтогенеза заключается в увеличении размеров клеток (Iliev et al., 2018), тогда как их ультраструктурная организация практически не изменяется (Greeley, White-Hunt, 2016). Размер кардиомиоцитов и их ядер прогрессивно увеличиваются, что объясняется полиплодидацией без кариокинеза, и стабилизируется к 45 сут (Загоруйко, Загоруйко, 2017).

Преобразование эпикарда неполовозрелых крыс

Эпикард сердца крысы на 1 сут постнатального периода онтогенеза образован слоем гетерогенных по форме и размеру мезотелиоцитов, лежащих на субмезотелиальном слое (Чумасов и др., 2017). Для новорожденных крыс характерна субэпикардиальная локализация вегетативных нервных узлов и сплетений в предсердиях и желудочках, тогда как иннервация миокарда развита незначительно (Чумасов и др., 2009).

СТРОЕНИЕ СЕРДЦА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Крысы достигают половой зрелости к 60 сут постнатального периода развития, однако рост животных и увеличение размеров сердца продолжается и в пубертатный период (табл. 3). Строение сердца крыс аналогично таковому у человека (Buetow, Laflamme, 2018), однако имеет некоторые видовые особенности.

В частности, у крыс правый и левый атриовентрикулярные клапаны не имеют четкого разделения створок. Сухожильные нити, прикрепляющиеся к створкам атрио-вентрикулярных клапанов, следуют от свободного конца сосочковых мышц или непосредственно от стенки желудочка (Buetow, Laflamme, 2018).

Проводящая система сердца крыс подробно описана у половозрелых крыс линий Вистар и Спрг-Доули. Синусно-предсердный узел у крыс локализован в стенке правого предсердия, вдоль артерии синусно-предсердного узла (Buetow, Laflamme, 2018), предсердно-желудочный узел – в нижней части межпредсердной перегородки (Mochet et al., 1975). Предсердно-желудочный пучок и ножки предсердно-желудочкового пучка следуют в межжелудочковой перегородке. Терминальным компонентом проводящей системы сердца являются субэндокардиальная проводящая сеть, локализованная под эндокардом желудочек. Миокард предсердий в области атриовентрикулярного соединения представляет собой правое и левое кольца проводящей системы сердца крыс. На основании сердца в области межпредсердной перегородки расположен ретроаортальный узел. Не доказан вклад ретроаортального узла, левого и правого колец проводящей системы сердца в нормальное функционирование сердца крыс (Atkinson et al., 2013).

Строение эндокарда половозрелых крыс

У половозрелых крыс эндокард представлен одним слоем эндотелиоцитов и тонким соединительнотканным субэндотелиальным слоем, более выраженным в предсердиях, нежели в желудочках (Buetow, Laflamme, 2018). У половозрелых крыс эндотелиоциты, выстилающие полости предсердий и желудочек, являются уплощенными клетками с гладкой люминальной поверхностью. В эндотелиоцитах, выстилающих клапаны сердца, наблюдаются признаки высокой секреторной активности (Чумасов и др., 2019). В основании клапана строма представлена плотной оформленной соединительной тканью, тогда как строма апикальной части клапана сформирована менее упорядоченной, богатой основным аморфным веществом соединительной тканью.

Строение миокарда половозрелых крыс

В миокарде половозрелых крыс линии Вистар до 96% кардиомиоцитов – двуядерные клетки (Bensley et al., 2016; Загоруйко и др., 2019). Митохондрии зрелого кардиомиоцита занимают 30–40% объема клетки и формируют кластеры, объединенные межмитохондриальными контактами (Иванченко, Твердохлеб, 2014). Секреторные кардиомиоциты у половозрелых крыс локализуются

исключительно в предсердиях, процессы синтеза, накопления и высвобождения секреторных везикул в них сбалансированы (Shevchenko, 2019).

В миокарде у половозрелых крыс кардиомиоциты преобладают по объему, но не по численности, составляя 30% клеток миокарда. Среди других типов клеток выявляются эндотелиоциты (64%), фибробласты (27%) и лейкоциты (9%) (Guo, Ru, 2020). Эндомизий миокарда представлен коллагеновыми волокнами, окружающими отдельные кардиомиоциты, перимизий миокарда представляет собой более выраженную сеть коллагеновых волокон, окружающую группы кардиомиоцитов. У беспородных крыс удельный объем клеток и волокон соединительной ткани в предсердиях преобладает над таковым в желудочках (Павлович и др., 2007). Соединительная ткань миокарда богата кровеносными капиллярами (Buetow, Laflamme, 2018).

Проводящая система сердца крыс образована нодальными проводящими кардиомиоцитами, переходными проводящими кардиомиоцитами и миоцитами Пуркинье. Нодальные проводящие кардиомиоциты – это мелкие одноядерные веретеновидные клетки, в цитоплазме которых определяются неупорядоченно расположенные миофibrиллы, митохондрии, выраженный пластинчатый комплекс, саркоплазматический ретикулум. У крыс линии Вистар Т-трубочки у нодальных кардиомиоцитов отсутствуют (Волкова и др., 2011). Переходные проводящие кардиомиоциты – это более крупные клетки полигональной формы, имеющие одно крупное центрально расположенное ядро и немногочисленные миофibrиллы. Сарколемма переходных проводящих кардиомиоцитов образует широкие инвагинации (Mochet et al., 1975). Миоциты Пуркинье – это крупные овальные клетки, которые по размеру превосходят переходные проводящие кардиомиоциты. У беспородных крыс миоциты Пуркинье характеризуются центральным расположением ядра и эозинофилией цитоплазмы без поперечной исчерченности (Павлович, 2007).

Нодальные и переходные проводящие кардиомиоциты располагаются в узлах проводящей системы сердца крысы небольшими группами, окруженными соединительной тканью (Волкова и др., 2011). Предсердно-желудочный пучок образован переходными проводящими кардиомиоцитами и миоцитами Пуркинье, расположенными параллельно его продольной оси. Соединительная ткань локализована на периферии предсердно-желудочкового пучка (Buetow, Laflamme, 2018). Субэндокардиальная проводящая сеть сформирована миоцитами Пуркинье.

Строение эпикарда половозрелых крыс

Эпикард у половозрелых крыс образован слоем мезотелия и незначительным количеством подлежащей соединительной ткани (Buetow, Laflamme, 2018).

У половозрелых крыс определяются эндокардиальное, миокардиальное и эпикардиальное нервные сплетения. Афферентные нервные волокна обнаруживаются во всех оболочках сердца. Терминалы эфферентных нервных волокон локализованы, преимущественно, в местах впадения в предсердия или выхода из желудочков кровеносных сосудов, а также в миокарде предсердий, миокарде передней и задней стенок желудочков. В области верхушки сердца в миокарде плотность терминалей эффекторных нервных волокон низкая (Чумасов и др., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитие сердца у крыс в целом аналогично таковому у человека (Buetow, Laflamme, 2018), однако, имеет ряд особенностей, которые следует учитывать при интерпретации результатов экспериментальных исследований.

1. У крыс пик пролиферативной активности кардиомиоцитов приходится на поздние этапы пренатального периода онтогенеза, тогда как у человека кардиомиоциты прекращают делиться к концу пренатального периода развития (Xavier-Vidal et al., 1995).

2. Переход с гиперпластического типа роста миокарда на гипертрофический тип у крыс наблюдается на 4 сутки постнатального периода онтогенеза, тогда как у человека происходит еще внутриутробно (Xavier-Vidal et al., 1995).

3. В отличие от миокарда человека, в котором определяются одноядерные полиплоидные кардиомиоциты (Bergmann et al., 2015), в миокарде крыс гипертрофический тип роста миокарда заключается в появлении двуядерных кардиомиоцитов.

4. В составе эпикарда крыс, в отличие от такого у человека, отсутствуют или немногочисленны адипоциты. Это может быть связано с тем, что венечные артерии в сердце крыс локализуются не в толще эпикарда, как у человека, а интрамиокардиально.

5. Субэндокардиальная основа у крыс имеет незначительную толщину, в сравнении с таковой в эндокарде человека.

6. Атрио-вентрикулярные клапаны у крыс не имеют четкого разделения на створки, а у человека четко определяются две створки в составе левого атрио-вентрикулярного клапана и три створки в составе правого атрио-вентрикулярного клапана.

Структурно-функциональные особенности сердца крыс в различные периоды онтогенеза необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

И.В. Мильто разработал концепцию, а также осуществил критический анализ содержания литературного обзора. О.Н Серебрякова участвовала в написании раздела “Развитие сердца крысы в пренатальном периоде онтогенеза”. В.В. Иванова участвовала в написании раздела “Развитие сердца крысы в постнатальном периоде онтогенеза”, подготовке рукописи к публикации, а также является автором иллюстраций. И.В. Суходоло утверждала окончательный вариант статьи для публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абрашова Т.В., Гущин Я.А., Ковалева М.А. и др. Доклинические исследования. Справочник: Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. / СПб.: Изд-во “ЛЕМА”, 2013. 116 с.

Волкова О.В., Тихонова Т.А., Илларионова Н.Г. и др. Цитоархитектоника синусно-предсердного узла сердца крысы // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. 2011. № 2. С. 44–45.

Загоруйко Г.Е., Загоруйко Ю.В. Возрастные изменения размеров и числа кардиомиоцитов, их ядер в процессе пренатального и раннего постнатального развития сердца крыс // Вестник проблем биологии и медицины. 2017. Т. 3. № 4. С. 304–311.

Загоруйко Г.Е., Загоруйко Ю.В., Филатова В.Л. Морфометрическая характеристика популяций кардиомиоцитов образующих паренхиму миокарда в процессе постнатального кардиомиогенеза // Вестник проблем биологии и медицины. 2018. Т. 2. № 4. С. 282–286.

Загоруйко Ю.В., Загоруйко Г.Е., Марцинowski В.П. и др. Закономерности кардиомиогенеза у крыс Wistar: рост суммарной численности кардиомиоцитов и образование популяции двуядерных миоцитов в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) // Вестник проблем биологии и медицины. 2019. Т. 2. № 1. С. 70–74.

- Иванченко М.В., Твердохлеб И.В.* Характер образования межмитохондриальных контактов в процессе онтогенетического формирования митохондриального аппарата в норме и в условиях гипоксического повреждения кардиогенеза // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2014. № 2. С. 10–17.
- Козлов В.А., Твердохлеб И.В., Шпонька И.С. и др.* Морфология развивающегося сердца (структура, ультраструктура, метаболизм). Днепропетровск: Днепропетровская государственная медицинская академия, 1995. 220 с.
- Павлович Е.Р., Писцова Т.В., Федосеев В.А.* Сравнительный количественный анализ соединительно-тканного компонента рабочего миокарда правого предсердия и левого желудочка сердца интактной крысы // Современные научные технологии. 2007. № 5. С. 73–74.
- Павлович Е.Р.* Электронно-микроскопическое исследование ножек пучка Гиса в сердце интактной крысы // Современные научные технологии. 2007. № 10. С. 78–79.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Иннервация сердца крысы (имmunогистохимическое исследование) // Морфология. 2009. Т. 135. № 2. С. 33–37.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Изучение строения развивающегося эпикарда и особенностей васкуляризации в сердце новорожденных крыс // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017. № 2(34). С. 12–18.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Структурно-функциональная характеристика эндотелиальных клеток сосудов сердца новорожденной крысы (имmunогистохимическое исследование) // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018. Т. 17(2). С. 80–85.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Структурные и функциональные особенности эндотелия сосудов сердца половозрелых крыс по данным иммуногистохимического исследования // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019. Т. 18(2). С. 70–77.
- Ямщикова Е.Н.* Морфологическая характеристика реактивных изменений сердечной мышечной ткани в условиях экспериментально измененного гистогенеза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург: Сам. гос. мед. ун-т, 2004, 22 с.
- Anderson R.H., Brown N.A., Webb S.* Development and structure of the atrial septum // Heart. 2002. V. 88(1). P. 104–110.
- Andrés A., Satrústegui J., Machado A.* Development of enzymes of energy metabolism in rat heart // Biol. Neonate. 1984. V. 45(2). P. 78–85.
- Anversa P., Olivetti G., Loud A.V.* Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes // Circ. Res. 1980. V. 46(4). P. 495–502.
- Atkinson A.J., Logantha S.J., Hao G. et al.* Functional, anatomical, and molecular investigation of the cardiac conduction system and arrhythmogenic atrioventricular ring tissue in the rat heart // J. Am. Heart Assoc. 2013. V. 2(6):e000246.
- Baldwin H.S., Jensen K.L., Solursh M.* Myogenic cytodifferentiation of the precardiac mesoderm in the rat // Differentiation. 1991. V. 47(3). P. 163–172.
- Banerjee I., Fuseler J.W., Price R.L. et al.* Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007. V. 293(3). P. H1883–H1891.
- Bensley J., De Matteo R., Harding R. et al.* Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 23756.
- Bergmann O., Zdunek S., Felker A. et al.* Dynamics of cell generation and turnover in the human heart // Cell. 2015. V. 161(7). P. 1566–1575.
- Bishop S.P., Anderson P.G., Tucker D.C.* Morphological development of the rat heart growing in oculo in the absence of hemodynamic work load // Circ. Res. 1990. V. 66(1). P. 84–102.
- Bradley A., Fant P., Guionaud S. et al.* Chapter 30 – Cardiovascular System // Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition) / Ed. Suttie A.W. Academic Press, 2018. P. 591–627.
- Bryda E.C.* The mighty mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research // Mo. Med. 2013. V. 110(3). P. 207–211.
- Buetow B.S., Laflamme M.A.* Cardiovascular // Comparative Anatomy and Histology (Second Edition). A Mouse, Rat, and Human Atlas / Eds. Treuting P., Dintzis S., Montine K.S. London: Academic Press, 2018. P. 163–189.
- Chacko K.J.* Observations on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos // J. Morphol. 1976. V. 150(3). P. 681–709.
- Chan W.Y., Cheung C.S., Yung K.M. et al.* Cardiac neural crest of the mouse embryo: axial level of origin, migratory pathway and cell autonomy of the splotch (Sp2H) mutant effect // Development. 2004. V. 131(14). P. 3367–3379.
- Chen X., Zhang L., Wang C.* Prenatal hypoxia-induced epigenomic and transcriptomic reprogramming in rat fetal and adult offspring hearts // Sci. Data. 2019. V. 6(238).
- Clark C.M., Jr.* Characterization of glucose metabolism in the isolated rat heart during fetal and early neonatal development // Diabetes. 1973. V. 22(1). P. 41–49.
- Clubb F.J., Jr., Bishop S.P.* Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy // Lab. Invest. 1984. V. 50(5). P. 571–577.
- Cohen E.D., Yee M., Porter G.A. et al.* Neonatal hyperoxia inhibits proliferation and survival of atrial cardiomyocytes by suppressing fatty acid synthesis // JCI Insight. 2021. 140785.
- Combs M.D., Yutzey K.E.* Heart valve development: regulatory networks in development and disease // Circ. Res. 2009. V. 105(5). P. 408–421.

- Corstius H.B., Zimanyi M.A., Maka N. et al.* Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts // *Pediatr. Res.* 2005. V. 57(6). P. 796–800.
- Couch J.R., West T.C., Hoff H.E.* Development of the action potential of the prenatal rat heart // *Circ. Res.* 1969. V. 24(1). P. 19–31.
- Deepe R., Fitzgerald E., Wolters R. et al.* The mesenchymal cap of the atrial septum and atrial and atrioventricular separation // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2020. V. 7(4). P. 50.
- van Kempen M.J., Fromaget C., Gros D. et al.* Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart // *Circ. Res.* 1991. V. 68(6). P. 1638–1651.
- DeRuiter M.C., Poelmann R.E., VanderPlas-de Vries I. et al.* The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? // *Anatomy and Embryology*. 1992. V. 185(5). P. 461–473.
- Dodou E., Verzi M.P., Anderson J.P. et al.* Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development // *Development*. 2004. V. 131(16). P. 3931–3942.
- Drake C.J., Fleming P.A.* Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo // *Blood*. 2000. V. 95(5). P. 1671–1679.
- Ferreira G.S., Veening-Griffioen D.H., Boon W.P.C. et al.* Levelling the translational gap for animal to human efficacy data // *Animals* (Basel). 2020. V. 10(7): 1199.
- Forman D.E., Cittadini A., Azhar G. et al.* Cardiac morphology and function in senescent rats: gender-related differences // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997. V. 30(7). P. 1872–1877.
- Gear R., Kendziora J.A., Belcher S.M.* Effects of bisphenol A on incidence and severity of cardiac lesions in the NCTR-Sprague-Dawley rat: A CLARITY-BPA study // *Toxicol. Lett.* 2017. V. 275. P. 123–135.
- Gourdie R.G., Green C.R., Severs N.J. et al.* Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart // *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1992. V. 185(4). P. 363–378.
- Greeley M.A., White-Hunt S.J.* Cardiovascular system // *Atlas of Histology of the Juvenile Rat* / Eds. Parker G.A., Picut C.A. Cambridge, MA: Academic Press, 2016. P. 423–437.
- Grego-Bessa J., Luna-Zurita L., del Monte G. et al.* Notch signaling is essential for ventricular chamber development // *Dev. Cell*. 2007. V. 12(3). P. 415–429.
- Guo Y., Pu W.T.* Cardiomyocyte maturation: New phase in development // *Circ. Res.* 2020. V. 126(8). P. 1086–1106.
- Hackam D.G., Redelmeier D.A.* Translation of research evidence from animals to humans // *JAMA*. 2006. V. 296(14). P. 1731–1732.
- Harmon J.R., Delongchamp R.R., Kimmel G.L. et al.* Effect of prenatal propranolol exposure on development of the postnatal rat heart // *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1986. V. 6(2). P. 139–150.
- Hildreth V., Webb S., Bradshaw L. et al.* Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart // *J. Anat.* 2008. V. 212(1). P. 1–11.
- Iliev A.A., Kotov G.N., Landzhov B.V. et al.* A comparative morphometric study of the myocardium during the postnatal development in normotensive and spontaneously hypertensive rats // *Folia Morphologica*. 2018. V. 77(2). P. 253–265.
- Ito T., Orino T., Harada K. et al.* Morphological maturation of left ventricle in fetal rats: changes in left ventricular volume, mass, wall thickness, and mitral valvular size // *Early. Hum.* 1998. V. 53(1). P. 1–7.
- Ito T., Harada K., Takada G.* In situ morphometric analysis of left and right ventricles in fetal rats: changes in ventricular volume, mass, wall thickness, and valvular size // *Tohoku. J. Exp. Med.* 2001. V. 193(1). P. 37–44.
- Ivanovitch K., Temiño S., Torres M.* Live imaging of heart tube development in mouse reveals alternating phases of cardiac differentiation and morphogenesis // *Elife*. 2017. V. 6. e30668.
- Jacob H.J.* Functional genomics and rat models // *Genome Res.* 1999. V. 9(11). P. 1013–1016.
- Jurado S.R., da Silva Franco R.J., Bankoff A.D.P. et al.* The heart is a target organ in offspring rats due to maternal hypertension // *J. Clin. Trial. Cardiol.* 2013. V. 1(1). P. 1.
- Kaur S., McGlashan S.R., Ward M.L.* Evidence of primary cilia in the developing rat heart // *Cilia*. 2018. V. 7: 4.
- Koban M.U., Moorman A.F., Holtz J. et al.* Expressional analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence // *Cardiovasc. Res.* 1998. V. 37(2). P. 405–423.
- L'Ecuyer T.J., Schulte D., Lin J.J.* Thin filament changes during in vivo rat heart development // *Pediatr. Res.* 1991. V. 30(3). P. 232–238.
- Lam M.L., Bartoli M., Claycomb W.C.* The 21-day postnatal rat ventricular cardiac muscle cell in culture as an experimental model to study adult cardiomyocyte gene expression // *Mol. Cell. Biochem.* 2002. V. 229(1–2). P. 51–62.
- Li F., Wang X., Capasso J.M., Gerdes A.M.* Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996. V. 28(8). P. 1737–1746.
- Li F., Wang X., Gerdes A.M.* Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organization // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997. V. 29(6). P. 1553–1565.
- Liang X., Wang G., Lin L. et al.* HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors // *Circ. Res.* 2013. V. 113(4). P. 399–407.
- Manner J., Yelbuz T.M.* Functional morphology of the cardiac jelly in the tubular heart of vertebrate embryos // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2019. V. 6(1). P. 12.
- Marcela S.G., Cristina R.M., Angel P.G. et al.* Chronological and morphological study of heart development in the rat // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2012. V. 295(8). P. 1267–1290.
- Markel M., Ginzel M., Peukert N. et al.* High resolution three-dimensional imaging and measurement of lung, heart, liver, and diaphragmatic development in the fetal rat based on micro-computed tomography (micro-CT) // *J. Anat.* 2020. V. 238(4). P. 1042–1054.

- Markwald R.R., Fitzharris T.P., Smith W.N.* Structural analysis of endocardial cytodifferentiation // *Dev. Biol.* 1975. V. 42(1). P. 160–180.
- Mochet M., Moravec J., Guillemot H. et al.* The ultrastructure of rat conductive tissue; an electron microscopic study of the atrioventricular node and the bundle of His // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1975. V. 7(12). P. 879–889.
- Moretti A., Caron L., Nakano A. et al.* Multipotent embryonic isll+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification // *Cell.* 2006. V. 127(6). P. 1151–1165.
- Morse D.E., Rogers C.S., McCann P.S.* Atrial septation in the chick and rat: a review // *J. Submicrosc. Cytol.* 1984. V. 16(2). P. 259–272.
- Nakagawa M., Thompson R.P., Terracio L. et al.* Developmental anatomy of HNK-1 immunoreactivity in the embryonic rat heart: co-distribution with early conduction tissue // *Anat. Embryol.* 1993. V. 187(5). P. 445–460.
- Navaratnam V., Woodward J.M., Skepper J.N.* Specific heart granules and natriuretic peptide in the developing myocardium of fetal and neonatal rats and hamsters // *J. Anat.* 1989. V. 163. P. 261–273.
- Nefodova O.O., Shatorna V.F., Halperin O.I. et al.* Cardiogenesis changes under the impact of cadmium chloride in rat embryogenesis // Мир медицины и биологии. 2019. Т. 15. № 3(69). С. 209–213.
- Nesbitt T., Lemley A., Davis J. et al.* Epicardial development in the rat: a new perspective // *Microsc. Microanal.* 2006. V. 12(5). P. 390–398.
- Olivetti G., Anversa P., Loud A.V.* Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations // *Circ. Res.* 1980. V. 46(4). P. 503–512.
- Ošťádalová I., Babický A.* Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period // *Physiol. Res.* 2012. V. 61. Suppl. 1:S1–7.
- Paige S.L., Plonowska K., Xu A. et al.* Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation // *Circ. Res.* 2015. V. 116(2). P. 341–353.
- Piao Y., Liu Y., Xie X.* Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages // *J. Toxicol. Pathol.* 2013. V. 26(1). P. 29–34.
- Ratajska A., Ciszek B., Sowińska A.* Embryonic development of coronary vasculature in rats: corrosion casting studies // *Anat. Rec.* 2003. V. 270(2). P. 109–116.
- Ribadeau-Dumas A., Brady M., Boateng S.Y. et al.* Sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA2) gene products are regulated post-transcriptionally during rat cardiac development // *Cardiovasc. Res.* 1999. V. 43(2). P. 426–436.
- Rodríguez-Rodríguez P., López de Pablo A.L., García-Prieto C.F. et al.* Long term effects of fetal undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress // *PLoS One.* 2017. V. 12(2).
- Rogers C.S., Morse D.E.* Atrial septation in the rat. I. A light microscopic and histochemical study // *J. Submicrosc. Cytol.* 1986. V. 18(2). P. 313–324.
- Sedmera D., McQuinn T.* Embryogenesis of the heart muscle // *Heart Fail. Clin.* 2008. V. 4(3). P. 235–245.
- Seki S., Nagashima M., Yamada Y. et al.* Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes // *Cardiovasc. Res.* 2003. V. 58(3). P. 535–548.
- Shevchenko K.M.* Morphological features of atrial myocardium embryonic development and its changes caused by hypoxia effect // *Regul. Mech. Biosyst.* 2019. V. 10 (1). P. 129–135.
- Stankunas K., Hang C.T., Tsun Z.Y. et al.* Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis // *Dev. Cell.* 2008. V. 14(2). P. 298–311.
- Suzuki H.R., Solursh M., Baldwin H.S.* Relationship between fibronectin expression during gastrulation and heart formation in the rat embryo // *Dev. Dyn.* 1995. V. 204(3). P. 259–277.
- Takeuchi J.K., Bruneau B.G.* Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors // *Nature.* 2009. V. 459(7247). P. 708–711.
- Thompson R.P., Göbel J., Lindroth J.R. et al.* Embryology of the endocrine heart // Functional Morphology of the Endocrine Heart / Eds. Forssmann W.G., Scheuermann D.W., Alt J. Springer: Berlin Heidelberg N.Y., 1989. P. 1–11.
- Van Vliet P., Wu S.M., Zaffran S. et al.* Early cardiac development: a view from stem cells to embryos // *Cardiovasc. Res.* 2012. V. 96(3). P. 352–362.
- Wei Y.F., Rodi C.P., Day M.L. et al.* Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system // *J. Clin. Invest.* 1987. V. 79(5). P. 1325–1329.
- Wenink A.C., Knaapen M.W., Vrolijk B.C. et al.* Development of myocardial fiber organization in the rat heart // *Anat. Embryol.* 1996. V. 193(6). P. 559–567.
- Wessels A., van den Hoff M.J., Adamo R.F. et al.* Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart // *Dev. Biol.* 2012. V. 366(2). P. 111–124.
- Witman N., Zhou C., Beverborg N.G. et al.* Cardiac progenitors and paracrine mediators in cardiogenesis and heart regeneration // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 100. P. 29–51.
- Xavier-Vidal R., Mandarim-de-Lacerda C.A.* Cardiomyocyte proliferation and hypertrophy in the human fetus: quantitative study of the myocyte nuclei // *Bull. Assoc. Anat. (Nancy).* 1995. V. 79(246). P. 27–31.
- Xue Q., Chen F., Zhang H. et al.* Maternal high-fat diet alters angiotensin II receptors and causes changes in fetal and neonatal rats // *Biol. Reprod.* 2019. V. 100(5). P. 1193–1203.
- Ya J., Markman M.W., Wagenaar G.T. et al.* Expression of the smooth-muscle proteins alpha-smooth-muscle actin and calponin, and of the intermediate filament protein desmin are parameters of cardiomyocyte maturation in the prenatal rat heart // *Anat. Rec.* 1997. V. 249(4). P. 495–505.

Rat Heart in the Prenatal and Postnatal Period of Ontogenesis

V. V. Ivanova^{1,*}, I. V. Milto^{1,2}, O. N. Serebrjakova¹, and I. V. Sukhodolo¹

¹*Siberian State Medical University, Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634055 Russia*

²*Seversk Biophysical Research Centre, P.O. Box 130, Seversk-13, 636013 Russia*

*e-mail: ivvera92@rambler.ru

Rats are the most common laboratory animals used in experiments to evaluate the cardiotoxic, including teratogenic, effects of therapeutic agents. It is necessary to have a detailed understanding of the developmental and structural features of the heart of model animals for a correct interpretation of experimental studies results. Cardiomorphogenesis in rats, in comparison with that in humans, has the following features: (1) the peak of the proliferative activity of cardiomyocytes decreases on the late stages of the prenatal period of ontogenesis; (2) the transition of the myocardium from the hyperplastic to the hypertrophic growth type occurs in the early postnatal period of ontogenesis; (3) hypertrophic type of myocardial growth consists in the formation of cardiomyocytes with several diploid nuclei – multinucleated cardiomyocytes.

Keywords: cardiomorphogenesis, ontogenesis, rat

ОБЗОРЫ

УДК 574/577,576.37,591.16,57.085.23

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ КРИОБАНКА ПО ОТНОШЕНИЮ К ДИКИМ И ИСЧЕЗАЮЩИМ ВИДАМ ОТРЯДА ХИЩНЫХ (CARNIVORA)

© 2021 г. С. Я. Амстиславский^{a,*}, В. И. Мокроусова^a, С. В. Окотруб^{a,b},
Е. Ю. Брусенцев^a, В. А. Напримеров^{a,c}

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

^bФГАОУ ВО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет” (НГУ),
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^cФГАОУ ВО “Новосибирский государственный аграрный университет” (НГАУ),
ул. Добролюбова, 160, Новосибирск, 630037 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.12.2020 г.

После доработки 24.03.2021 г.

Принята к публикации 28.03.2021 г.

В статье описаны основные достижения в области криоконсервации гамет и ранних эмбрионов млекопитающих отряда хищных. Обсуждаются также проблемы применения современных репродуктивных технологий по отношению к уязвимым и исчезающим видам этого отряда. В частности, криоконсервация ооцитов и эмбрионов у исследованных видов Carnivora осложнена обилием в них липидных грануля. Обзор сфокусирован на семействах кошачьих, псовых, куньих и медвежьих, поскольку именно для этих семейств накоплен ценный опыт применения современных достижений репродуктивной биологии в отношении недомesticированных видов, в том числе исчезающих. Для сравнения приведены базовые исследования на доместицированных представителях отряда – кошке, собаке и домашнем хорьке. При этом учитываются особенности репродуктивной биологии, характерные для представителей этих семейств.

Ключевые слова: исчезающие виды, кошачьи, псовые, куны, медвежьи, сперматозоиды, ооциты, преимплантационные эмбрионы, генетические ресурсы, криоконсервация

DOI: 10.31857/S0475145021040029

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, около 1200 видов, то есть примерно четвертая часть всех существующих видов млекопитающих, находятся под угрозой исчезновения, являются редкими или вымирающими. Больше всего таких видов среди грызунов, рукокрылых, приматов, китопарнокопытных и хищных (International Union for the Conservation of Nature (IUCN), <https://www.iucn.org>). На сегодняшний день отряд хищные (Carnivora) включает в себя 15 семейств (по данным NCBI taxonomy browser; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Наиболее изученными из них в плане репродуктивной биологии являются псовые (Canidae), куны (Mustelidae), медвежьи (Ursidae) и кошачьи (Felidae) (Amstislavsky et al., 2012). В каждом из этих четырех семейств есть виды с разным охранным статусом (<https://www.iucn.org>). Достаточно остро стоит проблема исчезновения видов в семействе кошачьих (Lamberski, 2015). По

крайней мере, 16 из 36 диких представителей этого семейства являются исчезающими или уязвимыми (имеют статус endangered – EN или vulnerable – VU) (Lamberski, 2015). Среди семейства Canidae численность 5 из 38 видов снижается (<https://www.iucn.org>). В семействе куньих 14 представителей из 64 имеют статусы critically endangered (CR), EN и VU (<https://www.iucnredlist.org>). Наиболее остро стоит проблема исчезновения видов в семействе медведей: шесть из восьми видов семейства являются уязвимыми (<https://www.iucnredlist.org>).

Традиционный способ поддержания численности исчезающих и редких животных *in situ* – это создание охраняемых территорий с максимально благоприятными условиями для жизни (Gundu, Adia, 2014). Помимо крупных заповедников создают также небольшие питомники, фермы и зоопарки для разведения небольших популяций *ex situ*. Между тем, при разведении диких видов хищных в неволе возникает много проблем, в том

числе проблема адаптации к неволе, что препятствует их реинтродукции (Amstislavsky et al., 2008). Ввиду небольшой численности представителей редких видов хищных, живущих в зоопарках, требуется обновление их генетического материала для смягчения последствий инбридинга (Swanson et al., 2007).

Важнейшим подходом к сохранению генетического разнообразия различных таксонов млекопитающих является создание криобанков гамет и эмбрионов (Agca, 2012; Comizzoli, Holt, 2014). Этот подход, основанный на сочетании методов репродуктивной биологии и криобиологии, который впервые был предложен более 40 лет назад Б.Н. Вепринцевым и Н.Н. Ротт, становится все более важным и значимым для сохранения биоразнообразия диких видов отряда хищных (Amstislavsky et al., 2012).

Усовершенствование методов работы с гаметами и эмбрионами млекопитающих, а также создание криобанков поможет поддерживать генетическое разнообразие животных в зоопарках без перемещения их из естественной среды обитания, с использованием транспортировки криоконсервированных сперматозоидов между городами и странами, в сочетании с искусственным осеменением или экстракорпоральным оплодотворением *in vitro* и переносом эмбрионов (Swanson et al., 2007). Такой подход уже был продемонстрирован на гепардах (*Acinonyx jubatus*) с использованием замороженно-оттаяемых сперматозоидов, собранных от диких самцов в Намибии, что привело к получению потомства в зоопарках Северной Америки в результате искусственного осеменения (Wildt, Roth, 1997). Наряду с этим, было получено потомство в ходе программы сохранения и восстановления исчезающего вида куньих – черноногого хорька, предпринятой в США, благодаря криоконсервации семени, его сохранения в течение длительного времени в криобанке в сочетании с искусственным осеменением (Howard et al., 2015). Кроме криоконсервированных сперматозоидов, для повышения генетического разнообразия выборки производителей, содержащихся в зоопарках и специальных центрах, может быть использован и транспорт замороженных эмбрионов. В частности, эмбрионы оцелота были транспортированы в криоконсервированном виде из Бразилии в США, и получено живое потомство, что является альтернативой транспортировки живых представителей вида (Conforti et al., 2008).

В данном обзоре будет рассмотрено применение современных репродуктивных технологий, прежде всего криоконсервации гамет и эмбрионов, в отношении четырех семейств отряда хищных: кошачьих, псовых, куньих и медвежьих. Будут изложены основные достижения и проблемы

применения этих подходов по отношению к диким представителям этих семейств.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА ХИЩНЫХ

Источник сперматозоидов для криобанка семени хищных

Извлечение сперматозоидов из эпидидимисов является достаточно распространенным способом их получения у представителей хищных (Luvoni, 2006). Этот метод практикуют и в настоящее время, особенно по отношению к домашним котам, поскольку эпидидимисы взрослых котов доступны в ветеринарных клиниках после процедур плановой стерилизации (Brusentsev et al., 2018). Эпидидимальное семя также может быть получено и у диких видов хищных, как правило, *post-mortem* или после стерилизации по медицинским показаниям. Так, было успешно криоконсервировано эпидидимальное семя бенгальского тигра (Cocchia et al., 2009).

Между тем, “золотым стандартом” получения семени по отношению к представителям отряда Carnivora является электроэякуляция, которую успешно применяют по отношению к кошачьим (Donoghue et al., 1992; Amstislavsky et al., 2018), псовым (Johnson et al., 2014; Van den Berghe et al., 2018; Yatu et al., 2018), куньим (Van der Horst et al., 2006) и медвежьим (Anel-Lopez et al., 2017; Cai et al., 2018). В большинстве рассматриваемых нами работ на диких представителях отряда хищных исследователи используют именно эякуляторное семя (табл. 1, 2).

Весьма перспективным является также использование уретральной катетеризации для получения семени у различных диких представителей отряда хищных (Lueders et al., 2012, 2014; Kheirkhah et al., 2017; Jeong et al., 2018; Franklin et al., 2018). Между тем, в исследовании на рыжем волке было продемонстрировано, что семя, взятое с использованием уретральной катетеризации, обладало худшими характеристиками подвижности и меньшим объемом по сравнению с эякуляторным (Franklin et al., 2018). Образцы уретрального семени, полученного у азиатской золотой кошки, обладали меньшим объемом, но большей концентрацией сперматозоидов при сходных процентах подвижности по сравнению с электроэякуляторным семенем (Lueders et al., 2014). Похожие результаты были получены при применении уретральной катетеризации к африканскому льву, камышовому и дальневосточному лесному коту (Lueders et al., 2012; Kheirkhah et al., 2017; Jeong et al., 2018).

Также успешно используется на кошачьих и мануальный метод, хотя проигрывает электро-

Таблица 1. Криоконсервация сперматозоидов диких представителей отряда хищных (Carnivora)¹

| Вид/подвид | Криопротектор (охлаждение в парах LN ₂ , если нет сноски) | Показатели после оттаивания (жизнеспособность, подвижность, фертильность), % | | | Ссылка |
|---|---|--|----------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | Ж | П/ПП/ИПС | проверка на фертильность | |
| Семейство кошачьих (Felidae) | | | | | |
| Лев (<i>Panthera leo</i>) | 4.7% глицерин | — | 31/15/— | — | Luther et al., 2017 |
| Ягуар (<i>Panthera onca</i>) | 6% глицерин | 46 | 46/—/— | — | Silva et al., 2019 |
| Суматранский тигр (<i>Panthera tigris sumatrae</i>) | 3% глицерин | 85 | 30/—/— | + | Karja et al., 2016 |
| Бенгальский тигр (<i>Panthera tigris tigris</i>) | 4% глицерин* | — | 73/—/79 | + | Donoghue et al., 1992 |
| Амурский тигр (<i>Panthera tigris altaica</i>) | 4% глицерин* | | 58/—/74 | | |
| Леопард (<i>Panthera pardus</i>) | 4% глицерин | — | 32/—/— | + | Jayaprakash et al., 2001 |
| Индокитайский леопард (<i>Panthera pardus delacouri</i>) | 5% глицерин | 42 | 37/—/— | + | Thuwanut et al., 2017 |
| Дымчатый леопард (<i>Neofelis nebulosa</i>) | 5% глицерин | 28 | 27/2/28 | + | Tipkantha et al., 2016 |
| Кот-рыболов (<i>Prionailurus viverrinus</i>) | 4% глицерин | — | —/38/— | + | Vansandt et al., 2016 |
| Суматранская кошка (<i>Prionailurus planiceps</i>) | 5% глицерин | 34 | 21/1/— | + | Thuwanut et al., 2011 |
| Пиренейская рысь (<i>Lynx pardinus</i>) | 4% глицерин | — | 34/—/43 | + | Ganan et al., 2009a |
| Рыжая рысь (<i>Lynx rufus</i>) | 4% глицерин | — | —/—/49 | + | Ganan et al., 2009b |
| Оцелот (<i>Leopardus pardalis</i>) | 4% глицерин* | 55 | 51/—/— | + | Stoops et al., 2007 |
| Онцилла (<i>Leopardus tigrinus</i>) | 4% глицерин* | — | —/—/51 | + | Baudi et al., 2008 |
| Кот Жоффруа (<i>Leopardus geoffroyi</i>) | 4% глицерин | — | —/—/46 | + | Sestelo et al., 2018 |
| Манул (<i>Felis manul</i>) | 4% глицерин | — | —/37/— | + | Vansandt et al., 2016 |
| Черноногая кошка (<i>Felis nigripes</i>) | 4% глицерин | — | —/44/— | + | Vansandt et al., 2018 |
| Барханный кот (<i>Felis margarita</i>) | 4% глицерин | — | —/46/— | + | Vansandt et al., 2018 |
| Семейство собачьих (Canidae) | | | | | |
| Песец (<i>Alopex lagopus</i>) | 6% глицерин | 45 | 45/—/— | — | Stasiak et al., 2014 |
| Грилистый волк (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) | 7% (1 М) ДМСО | 51 | 20/—/— | — | Johnson et al., 2014 |
| Рыжий волк (<i>Canis rufus</i>) | 4% глицерин* | — | 11/—/— | — | Franklin et al., 2018 |
| Обыкновенная лисица (<i>Vulpes vulpes</i>) | 6% глицерин | — | —/—/47 | + | Yatu et al., 2018 |
| Гиеновидная собака (<i>Lycaon pictus</i>) | 2.5% глицерин | 58 | 33/—/59 | — | Van den Berghe et al., 2018 |
| Мексиканский волк (<i>Canis lupus baileyi</i>) | 4% глицерин* | 79 | —/—/— | — | Zindl et al., 2006 |
| Койот (<i>Canis latrans</i>) | 5% глицерин [#] | 24 | 20/—/— | — | Minter, DeLiberto, 2005 |
| Семейство медвежьих (Ursidae) | | | | | |
| Бурый медведь (<i>Ursus arctos</i>) | 6% глицерин [#] | 47 | 68/37/— | — | Anel-Lopez et al., 2017 |
| Гималайский медведь (<i>Ursus thibetanus japonicus</i>) | 8% глицерин | 58 | 26/—/— | — | Okano et al., 2006 |
| Семейство куньих (Mustelidae) | | | | | |
| Канадская выдра (<i>Lontra canadensis</i>) | 4% глицерин* | — | —/59/— | — | Bateman, Swanson, 2017 |
| Степной хорек (<i>Mustela eversmanni</i>) | 4% глицерин | 60 | —/—/— | — | Van der Horst et al., 2009 |
| Черноногий хорек (<i>Mustela nigripes</i>) | 4% глицерин* | — | 45/3/— | + | Howard et al., 2015 |

Ж – жизнеспособность, П – подвижность, ПП – прогрессивная подвижность, ИПС – индекс подвижности сперматозоидов; ИО – искусственная инсеминация, * – охлаждение на сухом льду, [#] – охлаждение на программном замораживателе; ¹ во всех исследованиях, приведенных в таблице, использовали эякуляторное семя.

Таблица 2. Криоконсервация сперматозоидов представителей отряда хищных (Carnivora) с использованием фирменных криопротективных смесей

| Вид/подвид | Криопротектор (охлаждение в парах LN ₂ , если нет сноски) | ЭЯ/ЭП | Показатели после оттаивания (жизнеспособность, подвижность, фертильность), % | | | Ссылка |
|---|--|-------|--|----------|-----------------------------|--|
| | | | Ж | П/ПП/ИПС | проверка на фертильность | |
| Семейство кошачьих (Felidae) | | | | | | |
| Домашняя кошка (<i>Felis silvestris catus</i>) | CaniPlus Freeze (Minitube, Germany) | ЭП | 51 | 31/7/– | + | Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018 |
| | SpermFreeze (FertiPro, Belgium) | ЭП | 54 | 27/15/– | + | Brusentsev et al., 2018 |
| | BotuCrio (Botupharma, USA) | ЭП | 39 | 16/3/– | – | Macente et al., 2018 |
| Бенгальская кошка (<i>Prionailurus bengalensis</i>) | Freezing Medium TYB (FUJIFILM Irvine Scientific, Japan) | ЭЯ | 22 | –/–/– | – | Ha et al., 2011 |
| Дальневосточный лесной кот (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>) | CaniPlus Freeze (Minitube, Germany) | ЭЯ | 38 | 34/–/– | + | Amstislavsky et al., 2018 |
| Гепард (<i>Acinonyx jubatus</i>) | Freezing Medium TYB (FUJIFILM Irvine Scientific, Japan) | ЭЯ | – | –/–/62 | – | Terrell et al., 2012 |
| Маргай (<i>Leopardus wiedii</i>) | Freezing Medium TYB (FUJIFILM Irvine Scientific, Japan) [#] | ЭЯ | – | –/–/30 | – | Erdmann et al., 2019 |
| Пиренейская рысь (<i>Lynx pardinus</i>) | Biladyl (Minitub, Germany) | ЭЯ | – | 8/–/11 | + | Ganan et al., 2009a |
| Рыжая рысь (<i>Lynx rufus</i>) | Biladyl (Minitub, Germany) | ЭЯ | – | –/–/41 | + | Ganan et al., 2009b |
| Семейство псовых (Canidae) | | | | | | |
| Домашняя собака (<i>Canis lupus familiaris</i>) | CaniPlus Freeze (Minitube, Germany) | ЭЯ | – | –/65/– | – | Sichtar et al., 2015 |
| Рыжий волк (<i>Canis lupus rufus</i>) | CaniPlus Freeze (Minitube, Germany) | ЭЯ | – | 7/–/– | – | Franklin et al., 2018 |
| Семейство медвежьих (Ursidae) | | | | | | |
| Большая панда (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>) | Freezing Medium TYB (FUJIFILM Irvine Scientific, Japan) | ЭЯ | 36 | 25/24/– | – | Cai et al., 2018 |

[#] – охлаждение на программном замораживателе, ЭЯ – эякуляторное семя, ЭП – эпидидимальное семя, Ж – жизнеспособность, П – подвижность, ПП – прогрессивная подвижность, ИПС – индекс подвижности сперматозоидов.

эякуляции по объему полученного эякулята, пре-
восходит ее по количеству и подвижности спер-
матозоидов (Buranaamnuay, 2017). Однако, дан-
ный метод получения эякулята подразумевает
использование искусственной вагины и требует
определенной тренировки как персонала, так и
самого животного, что может быть проблемой
при работе с дикими особями (Zambelli, Cunto,
2006). Следует отметить, что для домашних псов
наиболее предпочтительным методом получения
семени является именно мануальный способ
(Nunez-Martinez et al., 2006).

Анализ литературы позволяет сделать заклю-
чение о том, что способ получения семени влияет
на некоторые морфологические и функциональ-
ные показатели семени, как до, так и после крио-
консервации. В частности, целостность акросомы
в эпидидимальном семени как до, так и после
криоконсервации, ниже по сравнению с тако-
вым, полученным в результате электроэякуляции
(Luvoni, 2006). Также целостность акросом ниже
и в сперматозоидах, полученных с помощью урет-
ральной катетеризации, по сравнению с таковы-
ми, полученными в результате электроэякуляции
(Franklin et al., 2018). Плюсом применения электроэякуляции по сравнению с уретральной кате-
теризацией является больший объем получаемого
семени (Lueders et al., 2014; Franklin et al., 2018).
Однако по имеющимся литературным данным
можно сделать вывод, что мануальный метод с
использованием искусственной вагины, а также
применение уретральной катетеризации имеют
лучшие показатели по числу сперматозоидов и их
подвижности, по сравнению с электроэякуляцией
(Lueders et al., 2014; Buranaamnuay, 2017).

СПОСОБЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЕНИ ХИЩНЫХ И ПРОВЕРКИ ЕГО ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Этапы криоконсервации сперматозоидов и подбор криопротекторов

Данные по криоконсервации сперматозоидов
диких представителей отряда хищных с использо-
ванием стандартных протоколов представлены в
табл. 1. Приведенные в табл. 1 результаты свиде-
тельствуют об эффективности криоконсервиро-
вания семени разных видов семейства кошачьих,
псовых, куньих и медведей. За исключением медве-
дей, у которых отсутствуют доместицированные ви-
ды, перед применением в отношении представите-
лей дикой фауны, характерные для разных се-
мейств хищных особенности криоконсервации
семени изучают на домашних видах, а именно –
домашних котах (Cheuquemant et al., 2018), до-
машних псах (Qamar et al., 2019) и домашних
хорьках (van der Horst et al., 2009).

Криоконсервация сперматозоидов стала
успешной после открытия криопротективных
свойств глицерина (Polge et al., 1949). В настоя-
щее время список криопротекторов, которые
успешно применяют для криоконсервации гамет
и эмбрионов, достаточно велик (Амстиславский
и др., 2015; Elliott et al., 2017; Rajan, Matsumura,
2018). Криопротекторы разделяют на проникаю-
щие и не проникающие в клетки (Shaw, Jones,
2003). Малые (мол. масса <100) гидрофильные,
проникающие в мембрану соединения, способ-
ные создавать водородную связь с молекулами
воды и образовывать водородные связи, напри-
мер, с белком (вместо молекулы воды), особенно
эффективны в качестве криопротекторов. Наличие
таких соединений в водных растворах снижает тем-
пературу образования льда (Shaw, Jones, 2003).

Для семени всех перечисленных видов сначала
проводят пробоподготовку, состоящую из не-
скольких стадий. На первом этапе обычно произ-
водят смешивание образца семени с разбавите-
лем, либо не содержащим основной проникаю-
щий криопротектор, либо содержащий этот
криопротектор в концентрации ниже финальной,
после чего смесь охлаждают до 4–5°C с последую-
щим выдерживанием при заданной температуре в
течение 1–3 ч (Van der Horst et al., 2009; Bateman,
Swanson, 2017; Franklin et al., 2018; Yatu et al., 2018).
В некоторых случаях, однако, этот этап эквили-
брации осуществляют без добавления в разбави-
тель проникающего криопротектора, заменяя его
на непроникающие, в частности, на глюкозу,
лактозу или трегалозу (Karja et al., 2016). Иногда
на первом этапе проникающий криопротектор
добавляют уже в финальной концентрации (John-
son et al., 2014; Erdmann et al., 2019). На втором
этапе полученную суспензию сперматозоидов
смешивают со вторым разбавителем, содержа-
щим основной проникающий криопротектор в
достаточно высокой концентрации (6–16%), так,
чтобы финальная концентрация основного крио-
протектора в смеси составила 3–8%.

Как показано, в подавляющем большинстве
работ по криоконсервации сперматозоидов пред-
ставителей отряда хищных в качестве основного
криопротектора используют глицерин, реже –
диметилсульфоксид (ДМСО) (табл. 1). При этом
практически всегда в качестве дополнительного
компоненты криопротективной смеси использу-
ют яичный желток в концентрации 20%, заменяя
его иногда на соевый лецитин. Во многих из при-
веденных в табл. 1 работах, наряду с основным
проникающим криопротектором и яичным желт-
ком, в криопротективную смесь добавляют не-
проникающие криопротекторы, такие как глюкоза
(Franklin et al., 2018), фруктоза (Anel-Lopez et al.,
2017; Franklin et al., 2018; Van den Berghe et al.,

2018), лактоза (Karja et al., 2016) и раффиноза (Yatu et al., 2018).

Кроме того, используют готовые фирменные разбавители семени для криоконсервации сперматозоидов хищных (табл. 2). Использование таких криопротекторных смесей имеет одно существенное достоинство – стандартизацию протоколов криоконсервации. На рынке есть фирменные разбавители семени для криоконсервации различных видов млекопитающих, преимущественно человека и домашних или сельскохозяйственных животных. Для представителей отряда хищных хорошо зарекомендовали себя CaniPlus Freeze от немецкой компании Minitube (Sichtar et al., 2015; Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018; Franklin et al., 2018), Freezing Medium TYB от Японско-Американской компании FUJIFILM Irvine Scientific (Ha et al., 2011; Terrell et al., 2012; Cai et al., 2018; Erdmann et al., 2019) и Sperm-Freeze от бельгийской компании FertiPro (Brusentsev et al., 2018).

После уравновешивания семени с криопротекторами его достаточно быстро охлаждают в парах жидкого азота (LN_2) до температуры $\sim -120^\circ\text{C}$ (Van der Horst et al., 2009; Stasiak et al., 2014; Johnson et al., 2014; Bateman, Swanson, 2017; Cai et al., 2018; Van den Berghe et al., 2018; Yatu et al., 2018) или охлаждают с использованием программного замораживателя до -100°C с последующим погружением в жидкий азот (Anel-Lopez et al., 2017). В некоторых случаях используют сухой лед и охлаждают до $\sim -80^\circ\text{C}$ (Donoghue et al., 1992; Stoops et al., 2007; Baudi et al., 2008; Howard et al., 2015; Franklin et al., 2018). В некоторых случаях семя сразу помещают в транспортировочный сосуд (dry shipper), где оно постепенно охлаждается до температуры $\sim -120^\circ\text{C}$ (Stoops et al., 2007; Johnson et al., 2014). На последнем этапе контейнеры с замороженной суспензией сперматозоидов помещают в криохранилище, где их сохраняют при температуре -196°C .

Для представителей семейства кошачьих при криоконсервации семени используют в качестве контейнера пластиковые соломинки, которые выдерживают в парах LN_2 (Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018), иногда в качестве контейнера используют криопробирки, а для замораживания сухой лед (Donoghue et al., 1992; Baudi et al., 2008) или dry shipper (Stoops et al., 2007). Для замораживания семени различных видов семейства псовых применяют либо пластиковые соломинки, которые выдерживают в парах LN_2 (Stasiak et al., 2014; Van den Berghe et al., 2018; Yatu et al., 2018) или dry shipper (Johnson et al., 2014), либо криопробирки и сухой лед (Franklin et al., 2018). Для криоконсервации семени представителей семейства куньих используют пластиковые соломинки в

качестве контейнера, которые выдерживают в парах LN_2 (Van der Horst et al., 2009), либо криопробирки и сухой лед (Howard et al., 2015; Bateman, Swanson, 2017). Для представителей семейства медвежьих при криоконсервации семени используют пластиковые соломинки в качестве носителя и, либо выдерживают в парах LN_2 (Cai et al., 2018), либо применяют программное замораживание (Anel-Lopez et al., 2017).

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, показатели жизнеспособности и подвижности семени после криоконсервации у исследованных видов хищных не сильно зависели от концентрации применяемого криопротектора (преимущественно глицерина в качестве основного криопротектора). Согласно литературным данным, способ охлаждения образцов семени (в парах азота, программное замораживание, на сухом льду, в драйшипере), также не оказывал критического влияния на результат криоконсервации. Между тем, наш собственный опыт работы с семенем кошачьих свидетельствует о том, что способ охлаждения образцов семени в парах азота является оптимальным, по крайней мере, при работе в условиях, приближенным к полевым, и более надежным по сравнению с охлаждением в драйшипере. Как видно из приведенных в табл. 2 данных, показатели эффективности криоконсервации семени представителей хищных с применением фирменных криопротективных смесей не сильно отличаются от таковых при применении самостоятельно изготовленных смесей на основе глицерина, используемых для тех же семейств хищных. Исключением, пожалуй, является Biladyl (Minitub, Germany), который показал заметное снижение подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов пиренейской и рыжей рыси по сравнению с криопротекторными смесями, приготовленными экспериментаторами на основе глицерина (Ganan et al., 2009a, 2009b).

Способы оценки эффективности криоконсервации сперматозоидов

Для подбора наиболее эффективного протокола криоконсервации семя до и после замораживания оценивают по различным показателям, таким как жизнеспособность, подвижность, морфология сперматозоидов, а также их оплодотворяющая способность. В случае работы с дикими видами животных важно подбирать методы оценки, в том числе и для проведения в “полевых” условиях, где нет доступа к полноценной лаборатории. Использование таких методов возможно, если в наличии имеется, как минимум, световой микроскоп. Для комфортной работы со сперматозоидами большинства видов млекопитающих желательно уве-

личение 200× или более. Для характеристики морфологический аномалий сперматозоидов необходимо более сильное увеличение (1000×).

Жизнеспособность сперматозоидов различных видов млекопитающих, в том числе представителей отряда хищных, обычно оценивают по состоянию их плазматической мембраны, например, с помощью окрашивания образца смесью красителей эозина и нигрозина, при котором первый краситель проникает в сперматозоиды, но только в те, у которых повреждена мембрана, а второй создает темный фон, на котором лучше видно окрашенные сперматозоиды (Bjorndahl et al., 2003; Tipkantha et al., 2016). Альтернативно жизнеспособность сперматозоидов можно оценить с помощью гипоосмотического теста (Ramu, Jeudran, 2012), при котором оценивается функциональная способность мембранны живых сперматозоидов поддерживать осмотическое равновесие в клетке. Данный тест, в частности, успешно применяется на сперматозоидах хищных (Silva et al., 2019). Помимо этого, применяют метод оценки с использованием флуоресцентных красителей SYBR Green I и йодистого пропидия (LIVE/DEAD тест), позволяющий получить информацию по процентному соотношению живых и мертвых сперматозоидов. В наших собственных исследованиях мы с успехом применяли эти методы для оценки жизнеспособности сперматозоидов кошачьих как на домашнем коте (Brusentsev et al., 2018), так и на дальневосточном лесном коте (Amstislavsky et al., 2018), а также на представителях рода *Lynx* (рис. 1).

Очень важным параметром качества семени является подвижность сперматозоидов. С помощью камеры Маклера можно как в лабораторных, так и в полевых условиях оценить концентрацию сперматозоидов в образце, их общую, прогрессивную и непрогрессивную подвижность (Amstislavsky et al., 2018); в некоторых случаях используют сочетание гемоцитометра Нейбауэра (для определения концентрации) и определения процента подвижных сперматозоидов на предметном стекле (Ganan et al., 2009a, 2009b). Иногда прогрессивно подвижные сперматозоиды классифицируют по шкале от 0 до 5 и рассчитывают индекс подвижности сперматозоидов (ИПС) (Baudi et al., 2008).

Большое значение имеет и морфология сперматозоидов, которая может быть оценена окрашиванием сухого мазка с последующей световой микроскопией при большом увеличении (Amstislavsky et al., 2018; Franklin et al., 2018) или без окрашивания мазка, с применением фазового контраста (Tipkantha et al., 2016). В некоторых исследованиях дополнительно оценивают целостность акросомы окрашиванием сперматозоидов красителем кумасси бриллиантовым синим с по-



Рис. 1. Сперматозоид евразийской рыси (*Lynx lynx*) после криоконсервации, окрашенный смесью красителей эозина и нигрозина (Vital Screen, FertiPro, Бельгия). Красная окраска свидетельствует о том, что сперматозоид мертвый. Масштабная полоска: 20 мкм.

следующей микроскопией (Larson, Miller, 1999; Ganan et al., 2009b).

Все вышеперечисленные показатели можно оценить более тщательно в условиях хорошо оборудованной лаборатории. Например, для оценки подвижности часто используют автоматические компьютерные системы (computer-assisted sperm analysis, CASA), которые рассчитывают не только процент подвижных сперматозоидов, но и скорость и траектории их движения (Luther et al., 2017). Также существуют автоматизированные системы для морфометрии сперматозоидов (Anel-Lopez et al., 2017). Оценку жизнеспособности сперматозоидов и целостности их акросом в лабораторных условиях можно проводить методом их окрашивания флуоресцентами с последующим использованием флуоресцентной или конфокальной микроскопии (Amstislavsky et al., 2018; Van den Berghe et al., 2018). С помощью флуоресцентов, например, JC-1 assay kit также можно оценить такие параметры, как активность митохондрий в сперматозоидах (Thuwanut et al., 2011).

Итоговой целью оценки параметров качества семени является определение его способности к оплодотворению (фертильность). Самым простым способом использования семени для оплодотворения является искусственное осеменение (ИО), однако такой способ весьма требователен к числу подвижных сперматозоидов в образце (Swanson et al., 2007). В случае работы с редкими и ценными видами хищных более экономичным выбором является экстракорпоральное оплодо-

творение (ЭКО) (Swanson et al., 2007). Для доместицированных видов хищных, в частности для домашней кошки, проще всего использовать гомологическое ЭКО, когда для проверки оплодотворяющей способности сперматозоидов домашнего кота ими экстракорпорально оплодотворяют ооциты домашней кошки (Brusentsev et al., 2018). Что касается диких видов хищных, то для проверки оплодотворяющей способности сперматозоидов после криоконсервации, технически проще использовать гетерологическое ЭКО. Между тем, возможность получения развивающихся эмбрионов путем гетерологического ЭКО продемонстрирована только для одного семейства отряда хищных – кошачьих. В частности, для оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов красной рыси (Ganan et al., 2009b), пиренейской рыси (Ganan et al., 2009a) и дальневосточного лесного кота (Amstislavsky et al., 2018) были использованы ооциты домашней кошки. Поскольку для некоторых диких видов кошачьих характерен высокий процент тератозооспермии, это может ограничивать возможность применения ЭКО; в таком случае для оценки fertильности семени и получения эмбрионов может использоваться гомологическое или гетерологическое ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида). Для применения этого метода требуются единичные нормальные подвижные сперматозоиды. Метод ИКСИ был, в частности, успешно применен на гепарде, леопарде и льве с целью проверки оплодотворяющей способности сперматозоидов этих видов кошачьих после криоконсервации (Moro et al., 2014; Fernandez-Gonzalez et al., 2015).

Наш собственный опыт работы с диким представителем семейства кошачьих – дальневосточным лесным котом показал, что в условиях, приближенных к полевым, экспресс метод оценки жизнеспособности при помощи смеси красителей эозина и нигрозина и оценки их концентрации и подвижности при помощи камеры маклера оказывается вполне достаточно, по крайней мере для того, чтобы осуществить криоконсервацию семени с последующей более тщательной оценкой и изучением, в том числе и оплодотворяющей способности сперматозоидов после их оттаивания в лабораторных условиях (Amstislavsky et al., 2018). Между тем, крайне желательна предварительная апробация протоколов криоконсервации и оценки семени на доместицированном представителе семейства, в данном случае – на домашнем коте (Brusentsev et al., 2018).

Показатели жизнеспособности сперматозоидов после их криоконсервации у различных представителей отряда хищных

Анализ эффективности процедуры криоконсервации сперматозоидов (табл. 1, 2) после их оттаивания/отогрева выявил, что жизнеспособность образцов эякуляторного семени диких видов кошачьих, за исключением одного исследования составляет 22–55% ($43.75 \pm 6.92\%$ в среднем). У домашнего кота жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации обычно несколько выше и составляет 47–65% (Chatdarong et al., 2017; Cheuqueman et al., 2018; Jara et al., 2019). Между тем, в одном исследовании на сперматозоидах суматранского тигра была отмечена исключительно высокая жизнеспособность сперматозоидов после оттаивания – 85% (Kajja et al., 2016). В данном исследовании, наряду с глицерином и яичным желтком, в криопротективную смесь был добавлен дополнительный ингредиент, а именно Orgus ES paste, а в процессе эквилибрации образцов семени использовали глюкозу, лактозу или раффинозу.

Жизнеспособность эякуляторного семени у диких псовых составила 24–79% ($51.4 \pm 8.9\%$ в среднем); причем для гривистого волка (*Chrysocyon brachyurus*) была обнаружена большая эффективность использования ДМСО по сравнению с глицерином (Johnson et al., 2014), который является основным криопротектором при замораживании сперматозоидов других представителей отряда хищных (табл. 1). Между тем, сравнение ДМСО и глицерина, в качестве основного криопротектора при криоконсервации сперматозоидов рыжего волка, показало существенно более высокие характеристики подвижности при применении глицерина (Franklin et al., 2018). Для некоторых других диких представителей отряда псовых, а именно песца, рыжей лисицы, гиеновидной собаки и мексиканского волка, глицерин в концентрации 2.5–6.0% оказывал достаточно хороший криопротективный эффект и показатели жизнеспособности и (или) подвижности для размороженного семени были не ниже 45%. Эти показатели находятся в хорошем соответствии с таковыми для домашних псов: 45% жизнеспособности семени при применении 6% глицерина в качестве основного криопротектора (Qamar et al., 2019). Между тем, для койота и рыжего волка показатели жизнеспособности и (или) подвижности семени при использовании глицерина в качестве криопротектора оказались весьма низкими (табл. 1). Достаточно перспективным, на наш взгляд, является применение фирменной криопротективной смеси на основе глицерина, созданной специально для криоконсервации сперматозоидов представителей семейства псовых – CaniPlus Freeze

(Minitube, Германия). Показательно, что эта смесь, которая создавалась для работы с семенем домашних псов, оказалась эффективна при криоконсервации семени дикого представителя семейства псовых – рыжего волка (табл. 2).

Среди диких видов куньих жизнеспособность сперматозоидов была определена только у домашнего и степного хорька (*Mustela eversmanni*), и составляла 60% (Van der Horst et al., 2009). У других диких видов куньих, а именно – канадской выдры и черноногого хорька, была определена только подвижность сперматозоидов после процедур криоконсервации, которая также оказалась достаточно высокой, соответственно 59 и 45% (табл. 1).

У медвежьих разброс в жизнеспособности оттаянных сперматозоидов составляет 36–58% ($47 \pm 6.4\%$ в среднем). Было продемонстрировано, что у большой панды и бурого медведя эти показатели могут быть улучшены с помощью селекции сперматозоидов путем центрифугирования через коллоидный раствор (Anel-Lopez et al., 2017; Cai et al., 2018).

Оплодотворяющая способность оттаянного семени диких кошачьих в большинстве случаев определялась с помощью гетерологического ЭКО ооцитов домашней кошки (табл. 1, 2); процент дробления при этом составил 11–61%, в среднем $41.0 \pm 5.3\%$ в зависимости от вида: пиренейская рысь – 11% (Ganan et al., 2009a), рыжая рысь – 24% (Ganan et al., 2009b), оцелот – 29% (Stoops et al., 2007), дальневосточный лесной кот – 36% (Ams-tislavsky et al., 2018), барханный кот – 41% (Vansandt et al., 2018), индокитайский леопард – 46% (Thuwanut et al., 2017), кот Жофруа – 46% (Sestelo et al., 2018), черноногая кошка – 59% (Vansandt et al., 2018), кот-рыболов – 60% (Vansandt et al., 2016) и манул – 61% (Vansandt et al., 2016). Также проводили оценку на fertильность по доле оплодотворившихся ооцитов для суматранского тигра (Karja et al., 2016) и для дымчатого леопарда, которая составляла 46 и 16% соответственно (Tipkantha et al., 2016). Лишь в случае бенгальского и амурского тигра проводилось гомологическое ЭКО ооцитов тигрицы, которое показало 70% дробления (Donoghue et al., 1992). Для некоторых видов собачьих и куньих проводили ИО, при этом частота наступления беременности у обыкновенной лисицы достигала 81% (Yatu et al., 2018), а у черноногого хорька – 28% (Howard et al., 2015).

Достижения и проблемы криоконсервации сперматозоидов представителей отряда хищных

В отряде хищных насчитывается 15 семейств (по данным NCBI taxonomy browser; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

Общей проблемой для отработки наиболее эффективных репродуктивных технологий по отношению к большинству этих семейств, является отсутствие доместицированных видов. Лишь для кошачьих, псовых и куньих имеются доместицированные представители, а именно – домашняя кошка, собака и хорек фуру, которые позволяют отработать соответствующие технологии получения и криоконсервации гамет и эмбрионов (Wildt et al., 1992), в частности, сперматозоидов, которые потом легче адаптировать к диким представителям этих семейств. Именно по этой причине, лишь для диких представителей данных трех семейств, а также медведей, имеются успешные работы с достаточно высокими показателями жизнеспособности семени после криоконсервации, что и отражено в табл. 1 и 2. Отдельно следует упомянуть медведей. Для этого семейства хищных нет доместицированных видов, которые могли бы быть использованы в качестве “модели” для отработки технологий, направленных на изучение диких видов. Между тем, как говорилось выше, шесть из восьми видов семейства являются уязвимыми. Соответственно, на это семейство были направлены большие усилия исследователей, и имеются работы по криоконсервации семени медвежьих (табл. 1, 2). По остальным видам хищных, не принадлежащих к этим четырем семействам, имеются лишь единичные работы, в которых обсуждается криоконсервация семени (Rodrigues da Paz, dos Santos Avila, 2015; Komatsu et al., 2021).

Серьезной проблемой, по крайней мере, для кошачьих, является тератоспермия, то есть присутствие сперматозоидов с морфологическими нарушениями, характерная для некоторых представителей данного семейства (Pukazhenti et al., 2006; Howard, Wildt, 2009). Низкий процент нормальных сперматозоидов (менее 40%) характерен для львов, ягуарунди, техасского подвида пумы; еще более низкий процент (20% и ниже) характерен для гепарда, дымчатого леопарда, и флоридского подвида пум, известного больше как “пантеры Флориды” (Pukazhenti et al., 2006). Между тем, как по данным этих авторов, так и по нашим собственным наблюдениям, для бенгальской кошки, в частности для подвида этой кошки – дальневосточного лесного кота, а также для некоторых других представителей кошачьих, не характерна тератоспермия (Pukazhenti et al., 2006). Авторы данного исследования считают, что тератоспермия характерна, в наибольшей мере, для тех видов кошачьих, у которых, в силу тех или иных причин, снижен уровень гетерозиготности и для которых уровень инбридинга достаточно высок; характерным примером таких кошачьих являются гепарды и “пантеры Флориды” (Pukazhenti et al.,

2006). Следует отметить, что проблема тератоспермии характерна не только для кошачьих. Высокий уровень тератоспермии отмечен для черного хорька (Howard, Wildt, 2009), вида куньих, который был на грани полного исчезновения и был восстановлен из популяции, которая состояла из 18 особей, причем лишь семь из них (три самца и четыре самки) были отобраны для программы восстановления этого вида куньих (Howard et al., 2015).

Как уже было сказано выше, основным способом взятия семени у живых представителей диких видов хищных является электроэякуляция, которую осуществляют под наркозом (Swanson, 2003). Имеются лишь отдельные исключения, в частности, обыкновенная лисица и песец, у которых, в условиях разведения на ферме, удавалось систематически получать эякулят мануальным способом (Jalkanen, 1993; Andraszek et al., 2020). Несмотря на то, что дозы и тип наркоза достаточно хорошо отработаны для представителей разных семейств отряда хищных, тем не менее, это является серьезным воздействием на животное, и соотвественно с определенным риском для его здоровья. Исходя из нашего опыта работы с куньими и кошачьими, проблемой является также то, что у некоторых особей вообще не удается получить эякуляцию при применении этого способа.

Проведенный анализ литературы позволяет сделать вывод о том, что в качестве основного криопротектора для замораживания семени различных представителей хищных чаще всего используется глицерин. Именно этот криопротектор был впервые использован для замораживания сперматозоидов более 70 лет назад (Polge et al., 1949) и до сих пор является криопротектором выбора при криоконсервации семени хищных (табл. 1). Использование данного криопротектора в некоторых случаях позволяет получить достаточно высокие показатели жизнеспособности и подвижности сперматозоидов различных представителей семейства кошачьих, псовых, медвежьих и куньих. Применение фирменных криопротекторных смесей (табл. 2), в целом, не дает ощутимого прироста показателей жизнеспособности после криоконсервации сперматозоидов различных видов диких хищных по сравнению с самостоятельно приготовленными криопротекторными смесями на основе глицерина (табл. 1). Между тем, использование фирменных криопротекторных смесей создает определенные преимущества при работе в условиях приближенным к полевым, о чем свидетельствует и наш собственный опыт (Amstislavsky et al., 2018).

Данные по жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации, полученные на представителях разных семейств хищных, тяжело поддаются

сравнению, так как исследователи рассматривали различные индикаторы, такие как жизнеспособность, подвижность, оплодотворяющая способность сперматозоидов с использованием разных методов. В частности, fertильность (оплодотворяющую способность) сперматозоидов исследовали либо путем гомологического, либо путем гетерологического ЭКО, либо путем ИО. Создает определенные сложности и является достаточно серьезной проблемой также малый объем эякулята при работе с некоторыми дикими видами хищных (Luvoni, 2006; Franklin et al., 2018). Именно малый объем эякулята и относительный дефицит семени является важным аргументом в пользу выбора именно ЭКО, при работе с криоконсервированным семенем диких видов хищных семейства кошачьих, для этого способа требуется в сотни раз меньше подвижных жизнеспособных сперматозоидов, чем для ИО (Swanson et al., 2007).

Между тем, выбор того или иного способа работы с семенем, находящимся в криобанке, определяется конкретным видом хищных и осуществляется либо с экспериментальными целями, либо в контексте программы сохранения этого вида. Показательным примером, который, без сомнения является серьезным достижением в данной области, является применение криобанка в контексте усилий по сохранению вида черноногого хорька (*Mustela nigripes*) в Северной Америке (Howard et al., 2015). Более 130 потомков было получено путем ИО в ходе многолетней программы восстановления численности этого вида куньих (Howard, Wildt, 2009; Howard et al., 2015). Следует отметить, что, несмотря на то, что в большинстве случаев для этого использовали сперматозоиды не подвергавшиеся криоконсервации, потомство было получено также и после ИО сперматозоидами, взятыми из криобанка, причем в некоторых случаях, эти сперматозоиды сохранялись в криобанке в течение двух десятилетий (Howard et al., 2015). Это может рассматриваться как несомненное достижение, поскольку криоконсервация мужских гамет в сочетании с другими методами, была успешно использована для восстановления вида хищных, находившегося на грани полного исчезновения.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ООЦИТОВ И ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА ХИЩНЫХ

Источник ооцитов и эмбрионов для криобанка представителей отряда хищных

Способы получения ооцитов и эмбрионов различаются в зависимости от вида животного и цели дальнейшего использования. В случае лабора-

Таблица 3. Криоконсервация ооцитов диких представителей отряда хищных (Carnivora)

| Вид животного | Криопротекторы | Характер криоконсервации, тип носителя | Лучший результат | Ссылка на исследование |
|--|--|---|---|------------------------|
| Семейство кошачьих (Felidae) | | | | |
| Сервал (<i>Leptailurus serval</i>) ^{MII} | Cryotech Vitrification kit (Cryotech, Japan) | Витрификация с использованием Rapid-I (Vitrolife, Sweden) | 70% живых ооцитов после окрашивания | Nowak et al., 2019 |
| Семейство псовых (Canidae) | | | | |
| Обыкновенная лисица (<i>Vulpes vulpes</i>) ^{GV} | 15% ЭГ, 15% ДМСО | Витрификация с использованием криопетли (cryoloop) | 42% ооцитов возобновивших мейоз, 5% дозревших до стадии МII после IVM | Cao et al., 2017 |
| Мексиканский волк (<i>Canis lupus baileyi</i>) ^{GV} | 15% ЭГ, 15% ДМСО, 0.5 M сахарозы | Витрификация с использованием Cryotop (Kitazato, Japan) | 41% живых ооцитов после окрашивания | Boutelle et al., 2011 |

^{MII} – криоконсервация зрелых ооцитов, ^{GV} – криоконсервация незрелых ооцитов.

торных модельных видов (например, домашняя кошка) чаще всего используют яичники, извлеченные после рутинной операции овариогистерэктомии в ветеринарных клиниках. Из таких яичников выделяют кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) путем измельчения ткани кортекса и аспирации ооцитов из фолликулов. После процедуры сбора КОК-сы подвергаются селекции по качеству на основе морфологических критериев. Например, среди кошачьих КОК-сов наиболее пригодными для дальнейшего развития считаются такие, которые имеют правильную сферическую форму, темную однородную ооплазму и окружены не менее чем пятью слоями кумулюсных клеток (Wood, Wildt, 1997). Ооциты в таких комплексах, как правило, находятся на стадии герминального везикула (т.е. незрелые); их либо сразу криоконсервируют, либо вначале осуществляют дозревание *in vitro* с целью последующей криоконсервации или оплодотворения *in vitro*. При работе с редкими дикими видами хищных такая методика используется только при наличии медицинских показаний для операции (Boutelle et al., 2011) или *post mortem*: в случаях гибели особей, содержащихся в зоопарках, чтобы сохранить ценный генетический материал (Kochan et al., 2019). Иногда для получения ооцитов от диких видов хищных применяют гормонально индуцированную стимуляцию суперовуляции с последующей лапароскопической пункцией антравальных фолликулов (Pope et al., 2006, 2012; Mastromonaco, Songsasen, 2020).

Особенностью представителей семейства псовых является то, что у них овуляция происходит

не на стадии МII, а на более ранней стадии мейоза; при этом ооциты после овуляции дозревают в яйцеводах (Chastant-Maillard et al., 2011). С этим связаны проблемы создания условий для дозревания *in vitro* ооцитов диких представителей этого семейства (Amstislavsky et al., 2012). Между тем, были предприняты вполне успешные попытки криоконсервации ооцитов диких представителей семейства псовых (табл. 3) Есть несколько работ, посвященных *in vitro* дозреванию ооцитов представителей отряда медвежьих, например, барibalы (Johnston et al., 1994) и бурого медведя (Yin et al., 2007). Что касается криоконсервации ооцитов медвежьих и куньих, в настоящее время пока не опубликовано работ на эту тему.

Эмбрионы для криоконсервации могут быть получены *in vitro* или *in vivo*. В первом случае оплодотворение ооцитов можно произвести путем традиционного ЭКО или с помощью ИКСИ (Pope, 2012, 2014). Эмбрионы представителей хищных, развившиеся *in vivo* чаще всего получают путем хирургического извлечения их из репродуктивных путей спустя несколько дней после оплодотворения *in vivo* (путем спаривания с самцом либо после ИО) у наркотизированных животных с сохранением их репродуктивной функции (Lindeberg et al., 2003; Piltti et al., 2004; Guaitolini et al., 2012).

Способы криоконсервации ооцитов и эмбрионов представителей отряда хищных

Существуют два способа замораживания ооцитов и эмбрионов млекопитающих – программное замораживание и витрификация (Whit-

tingham et al., 1972; Rall, Fahy, 1985; Saragusty, Arav, 2011). Программное замораживание является равновесным процессом, который характеризуется низкими скоростями охлаждения для поддержания внутриклеточной воды в переохлажденном состоянии, что способствует перемещению воды из внутриклеточных компартментов во внеклеточные, в конце концов, по окончании процесса внутриклеточные кристаллы льда образуются, но они мелкие и, соответственно, не слишком вредоносные для клеток (Mazur, 1990). В принципиальную схему программы входит первый этап охлаждения со скоростью 1–2°C/мин до температуры около –5...–7°C, при которой проводят принудительную нуклеацию льда во избежание спонтанной кристаллизации, и второй этап более медленного охлаждения (десятие доли градуса в минуту) до температуры ниже –30°C, при которой можно помещать носитель в жидкий азот. Для предотвращения повреждения и гибели клеток в процессе замораживания применяют различные криопротекторы, как описано выше.

Витрификация (стеклование) основывается на предположении о том, что при высоких концентрациях криопротектора и очень быстром снижении температуры клетки переходят в стекловидное состояние (витрифицируются), минуя стадию кристаллизации (Mazur, 1990). Переход раствора в аморфную фазу происходит обычно при высоких скоростях охлаждения — более 500°C/мин; при проведении витрификации используют криопротекторы в концентрации от 4 до 7 молей, то есть выше, чем при программном замораживании (Saragusty, Arav, 2011). В большинстве современных методов такие скорости охлаждения достигаются погружением материала непосредственно в жидкий азот (–196°C) или в переохлажденный воздух — например, закрытые системы Rapid-I (Nowak et al., 2019). Закрытые системы отличаются от открытых отсутствием прямого контакта материала с жидким азотом, который может привести к контаминации образца; однако при этом они могут проигрывать по скорости охлаждения и, следовательно, эффективности (Vajta et al., 2015). Наиболее популярными являются открытые системы, такие как OPS — open pulled straw (Luciano et al., 2009), Cryotop и Cryoloop (Mikolajewska et al., 2012). Помимо скорости охлаждения, важную роль также играют объем и вязкость среды, в которой криоконсервируют образцы (Saragusty, Arav, 2011).

Оба метода криоконсервации имеют свои преимущества и недостатки. Преимущество медленного замораживания заключается в использовании низких концентраций криопротекторов, тогда как для витрификации требуются высокие концентрации, которые связаны с химической

токсичностью и осмотическим шоком (Shaw, Jones, 2003). Однако витрификация является быстрым методом, позволяющим избежать этапа длительного охлаждения, что снижает криоповреждения, возникающие в клетках при их охлаждении до околонулевых температур и при замораживании клеток в результате кристаллизации внутриклеточной воды (Kim, 2013). Это преимущество особенно существенно при криоконсервации ооцитов и эмбрионов тех видов, у которых высокое содержание липидов в их репродуктивных клетках (Amstislavsky et al., 2019).

Способы оценки жизнеспособности ооцитов и эмбрионов в процессе и после криоконсервации

Существуют многочисленные способы оценки жизнеспособности ооцитов после процедуры криоконсервации. В работе Новак с соавторами (2019), для оценки выживаемости ооцитов сервала (*Leptailurus serval*) и манула (*Otocolobus manul*) после витрификации, их окрашивали флуоресцентными красителями: бромистым этидием (ETBr) в сочетании с диацетатом флуоресцеина (FDA). Живые ооциты с неповрежденной клеточной мембранный светятся в зеленом диапазоне длин волн, в то время как мертвые ооциты светятся ярко-оранжевым (Nowak et al., 2019). Помимо этого, используют пропидия йодид (PI), который окрашивает только мертвые ооциты с поврежденной мембранией; именно этот метод применили для оценки выживания ооцитов мексиканского волка после криоконсервации (*Canis lupus baileyi*) (Boutelle et al., 2011). Также применяют методы световой, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, кроме того, используют электронную микроскопию для оценки изменений в ооцитах после криоконсервации, в том числе и на субклеточном уровне (Turathum et al., 2010; Apparicio et al., 2013; Cao et al., 2017). Для оценки эффективности криоконсервации исследуют также митохондрии после окрашивания их митотрэкером (Cao et al., 2017). После витрификации ооцитов обыкновенной лисицы (*Vulpes vulpes*) оценивали содержание глутатиона — тиолового соединения, необходимого для пролиферации клеток, транспорта аминокислот, синтеза белков и ДНК, поддержания окислительно-восстановительного баланса. Было показано, что концентрация данного вещества значительно снижается в витрифицированных ооцитах после их оттаивания по сравнению с контролем (Cao et al., 2017). Важным методом оценки жизнеспособности ооцитов хищных после криоконсервации является их способность к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона, как было показано в работе Любони и Пеллиццари (2000) на ооцитах домашней кошки (*Felis silvestris catus*) (Luvoni, Pellizzari, 2000).

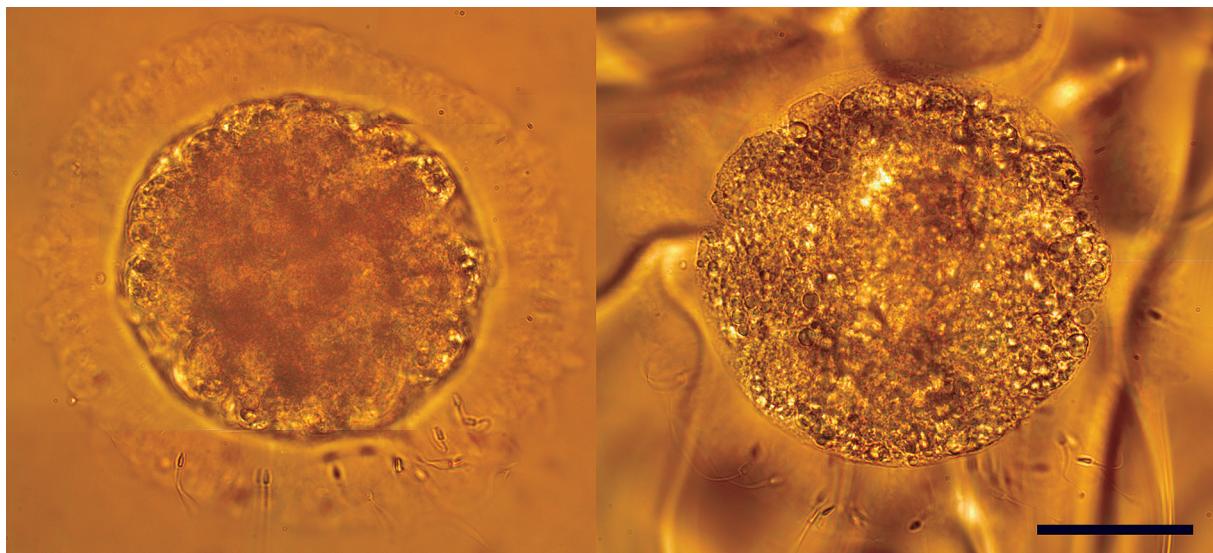


Рис. 2. Эмбрионы домашней кошки, культивированные *in vitro* в среде с добавлением линолевой кислоты. Слева эмбрион при комнатной температуре, справа – в процессе замораживания на криостате. Масштабная полоска: 50 мкм.

Эффективность криоконсервации эмбрионов оценивают по их способности к развитию в культуре *in vitro* после цикла замораживания/оттаивания (Crichton et al., 2003; Mokrousova et al., 2020b). Наиболее убедительный способ проверки жизнеспособности эмбрионов после криоконсервации – это трансплантация их соответствующему реципиенту. Такие работы на представителях отряда хищных проведены преимущественно на домашних кошках (Dresser et al., 1988; Pope, 2000, 2014), собаках (Nagashima et al., 2015; Hori et al., 2016) и хорьках (Lindeberg et al., 2003; Piltti et al., 2004; Sun et al., 2008), а также на нескольких диких видах кошачьих (Pope et al., 2006; Conforti et al., 2008; Pope et al., 2012).

Способов оценить происходящие в живых клетках процессы, непосредственно в ходе охлаждения и замораживания эмбрионов и ооцитов, не много. Классическим методом является криомикроскопия, в ходе которого можно следить за ходом кристаллизации в охлаждаемых образцах (Mazur, 1990). На рис. 2 представлен эмбрион домашней кошки до начала охлаждения и в процессе охлаждения, данные получены с использованием криомикроскопа. Существуют и другие методы, которые позволяют “заглянуть внутрь” образца при его охлаждении. В частности, метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) позволяет получить информацию о ходе кристаллизации в образце в процессе его охлаждения и оценить соотношение жидкой и твердой фазы воды (Kargrina et al., 2016). В ходе наших исследований с применением этой методики по отношению к эмбрионам и ооцитам домашней кошки удалось оценить температуру фазового пе-

рехода в процессе их охлаждения (Okotrub et al., 2018; Mokrousova et al., 2020b). Данная методика позволяет получать информацию об отдельных клетках в реальном времени в процессе их охлаждения, не вводя в клетки каких-либо меток. Наряду со спектроскопией КРС, для неинвазивного мониторинга живых клеток применяют также инфракрасную (ИК) спектроскопию (Ishigaki et al., 2016).

Современные достижения и проблемы криоконсервации ооцитов представителей отряда хищных

Ооциты и преимплантационные эмбрионы всех представителей отряда хищных, например, домашней кошки, содержат большое число внутриклеточных липидных гранул – ЛГ (Guraya, 1965; Amstislavsky et al., 2019). Содержание большого числа ЛГ в репродуктивных клетках млекопитающих может оказывать влияние на эффективность их криоконсервации (Hwang, Hochi, 2014; Amstislavsky et al., 2019). При этом, как мы полагаем, большую роль может играть не только количественный, но и качественный состав ЛГ, например, степень ненасыщенности содержащихся в них липидов. Существует предположение, что чем больше ненасыщенных жирных кислот содержится в ЛГ, тем ниже точка фазового перехода липидов при охлаждении клеток (Okotrub et al., 2018) и тем выше может быть эффективность их криоконсервации (Amstislavsky et al., 2019). Одним из способов модификации липидного состава ооцитов и эмбрионов млекопитающих является введение жирных насыщенных и ненасыщенных

жирных кислот (Aardema et al., 2017; Брусенцев и др., 2020; Ranneva et al., 2020). Поскольку спектры КРС чувствительны к структуре молекул и их окружению, измеряя КРС можно определять концентрацию веществ, их фазовое состояние и фазовые переходы (Mokrousova et al., 2020a, 2020b; Ranneva et al., 2020). С помощью спектроскопии КРС было показано, что клеточные липиды претерпевают размытый фазовый переход, при котором наблюдается разделение фаз (Mokrousova et al., 2020b). Нами было изучено распределение стеариновой кислоты, меченной дейтерием, в липидных гранулах ооцитов домашней кошки после культивирования *in vitro* (Ranneva et al., 2020). Исследование показало, что встраивание жирной кислоты происходит во все липидные гранулы ооцита. Кроме того, различные гранулы одного ооцита имеют разную концентрацию введенной кислоты в зависимости от времени культивирования (Ranneva et al., 2020). В настоящее время, данная работа продолжается нами в плане изучения влияния культивирования эмбрионов домашней кошки с линолевой кислотой на их способность переживать охлаждение и криоконсервацию (рис. 2).

Ооциты представителей отряда хищных иногда, хотя и редко, криоконсервируют путем программного замораживания (Luvoni, Pellizzari, 2000), чаще используют витрификацию (Boutelle et al., 2011; Galiguis et al., 2014; Cao et al., 2017; Turathum et al., 2018; Nowak et al., 2019). Результаты этих работ представлены в табл. 3. Исходя из теоретических предпосылок, в качестве наиболее предпочтительного криопротектора для криоконсервации ооцитов хищных млекопитающих может выступать ДМСО, поскольку именно он обладает липофильными свойствами и может легко проходить через цитоплазматические мембранны клеток, и, возможно, даже проникать непосредственно в ЛГ (Кулеширова и др., 2014). Действительно, чаще всего, протокол, предназначенный для криоконсервации ооцитов представителей семейств отряда хищных, включает в качестве одного из криопротекторов именно ДМСО (Boutelle et al., 2011; Galiguis et al., 2014; Cao et al., 2017; Turathum et al., 2018). В частности, с применением смеси криопротекторов, имеющих в своем составе ДМСО, успешно удалось витрифицировать ооциты домашней собаки (Turathum et al., 2010), кошки (Galiguis et al., 2014), обыкновенной лисицы (Cao et al., 2017) и мексиканского волка (Boutelle et al., 2011).

Между тем, для этих же целей иногда используют стандартные коммерческие наборы для витрификации. В частности, в работе Аппаричио с соавторами (Apparicio et al., 2013) КОК-сы домашней кошки были витрифицированы с использованием фирменной смеси криопротекто-

ров предназначенной для ооцитов крупного рогатого скота (Apparicio et al., 2013). Относительно недавно, ооциты сервала (*Leptailurus serval*) и манула (*Otocolobus manul*) криоконсервировали с использованием специального набора для витрификации, используемого в медицине: Cryotech Vitrification kit (Cryotech, Japan) (Nowak et al., 2019).

Достижения и проблемы криоконсервации эмбрионов представителей отряда хищных

На домашних кошках, собаках и хорьках были отработаны протоколы, как программного замораживания (Dresser et al., 1988; Gomez et al., 2003; Lindeberg et al., 2003; Tsujioka et al., 2008; Pope et al., 2011), так и витрификации (Piltti et al., 2004; Hori et al., 2016). Эти протоколы были применены к диким видам хищных. При этом наибольшее число работ по криоконсервации эмбрионов среди представителей отряда Carnivora было выполнено на кошачьих (Pope et al., 2012; Amstislavsky et al., 2012).

Как правило, программное замораживание при криоконсервации эмбрионов кошачьих используют чаще, чем витрификацию. Имеется лишь несколько исследований по витрификации эмбрионов кошачьих, причем все они проведены на домашней кошке. В одном из недавних исследований был выявлен высокий уровень апоптоза после витрификации эмбрионов домашних кошек (Ochota, Nizanski, 2018). Программное замораживание оказалось более щадящим способом по отношению к кошачьим эмбрионам, чем витрификация, если судить как по развитию эмбрионов в культуре *in vitro* (Pederson et al., 2009), так и по получению живого потомства (Pope et al., 2012). Результат получения живого потомства после витрификации эмбрионов домашней кошки обычно хуже, чем после программного замораживания. В исследовании, в котором эмбрионы домашней кошки после витрификации и оттаивания были пересажены реципиентам, родилось лишь пять котят: 6% от общего числа подсаженных эмбрионов. При этом наблюдались осложненные роды, всем кошкам приходилось делать кесарево сечение; более того, выжил лишь один котенок из пяти рожденных (Pope et al., 2012). В нашем недавнем исследовании не было обнаружено статистических различий по частоте развития *in vitro* и фрагментации ядер эмбрионов домашних кошек после замораживания/оттаивания и витрификации/отогрева (Mokrousova et al., 2020b). При сравнении же программного замораживания и витрификации по отношению к эмбрионам собаки, выяснилось, что, напротив, витрификация оказалась предпочтительнее, в связи

Таблица 4. Криоконсервация преимплантационных эмбрионов диких представителей отряда хищных (Carnivora)

| Вид животного | Крио-протекторы | Стадия | Тип криоконсервации | % развития ¹ | % беременных самок | % рождения ² | Ссылка на исследование |
|--|---------------------------------------|-------------|--|-------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| Семейство кошачьих (Felidae) | | | | | | | |
| Африканская дикая кошка (<i>Felis silvestris lybica</i>) | 10% ПГ и 0.125 M сахарозы | Дробления | Программное замораживание ³ | — | 14.3 (1/7) | 1.8 (1/55) ⁵ | Pope, 2000 |
| Амурский тигр (<i>Panthera tigris altaica</i>) | 16.5% ЭГ, 16.5% ДМСО и 0.5 M сахарозы | 2-кл и 4-кл | Витрификация ⁴ | 46 (32/70) | — | — | Crichton et al., 2003 |
| Каракал (<i>Caracal caracal</i>) | 10% ПГ и 0.125 M сахарозы | Морулы | Программное замораживание ³ | — | 33.3 (3/9) | 2.8 (3/109) ⁵ | Pope et al., 2006 |
| Оцелот (<i>Leopardus pardalis mitis</i>) | 10% ЭГ | Бластоциты | Программное замораживание ³ | — | 33.3 (3/9) | 12.5 (3/24) ⁶ | Conforti et al., 2008 |
| Черноногая кошка (<i>Felis nigripes</i>) | 10% ПГ и 0.125 M сахарозы | 2-кл | Программное замораживание ³ | — | 50 (1/2) | 14.3 (2/14) ⁵ | Pope et al., 2012 |

¹ После отогрева и культивирования *in vitro* (число развивающихся эмбрионов/общее число эмбрионов в эксперименте по культивированию); ² доля котят от общего числа трансплантированных эмбрионов (число котят/число эмбрионов); ³ с использованием классической схемы с модификацией; ⁴ с использованием OPS (open pulled straw) в качестве метода витрификации; ⁵ преимплантационные эмбрионы трансплантировали животным реципиентам после отогрева и культивирования *in vitro*; ⁶ преимплантационные эмбрионы трансплантировали животным реципиентам сразу после их отогрева, минуя процесс их культивирования *in vitro*.

с тем, что только после витрификации удалось получить живое потомство (Hori et al., 2016).

По отношению к куньим (Mustelidae) прямого сравнения витрификации и программного замораживания в рамках одного исследования не проводилось. Между тем, удалось успешно криоконсервировать эмбрионы домашнего хорька (*Mustela putorius furo*) при применении обоих этих способов и получить живое потомство как после программного замораживания (Lindeberg et al., 2003), так и после витрификации (Piltti et al., 2004; Sun et al., 2008).

До настоящего времени все случаи успешного применения криоконсервации эмбрионов диких представителей отряда Carnivora были отмечены исключительно на кошачьих (табл. 4). Так с использованием смеси пропиленгликоля и сахарозы в качестве криопротекторов удалось криоконсервировать дробящиеся эмбрионы африканской дикой кошки (*Felis silvestris lybica*), а после оттаивания и эмбриотрансфера от одной из кошек-реципиентов получить живого котенка (Pope, 2000). Та же самая смесь криопротекторов и сходный протокол замораживания были использованы для криоконсервации морул каракала (*Caracal caracal*); после эмбриотрансфера взятых из криобанка эмбрионов родились три нормальных котенка

(Pope et al., 2006). Аналогичным способом были успешно заморожены двухклеточные эмбрионы черноногой кошки (*Felis nigripes*), при этом удалось получить от одной кошки-реципиента двух живых котят (Pope et al., 2012). Для криоконсервации бластоцит оцелота (*Leopardus pardalis mitis*) в качестве криопротектора использовали этиленгликоль; после оттаивания и эмбриотрансфера было получено три котенка (Conforti et al., 2008).

Таким образом, практически все успешные исследования по криоконсервации эмбрионов диких видов кошачьих выполнены путем программного замораживания. Исключение составляет только амурский тигр (*Panthera tigris altaica*); в данном случае эффективной процедурой криоконсервации оказалась витрификация, а программное замораживание оказалось не эффективным (Crichton et al., 2003). Однако живое потомство после этих процедур получено не было, что не позволяет полностью оценить потенциал применения витрификации по отношению к эмбрионам кошачьих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные представители отряда хищных находятся под угрозой исчезновения или являются уязвимыми. Репродуктивные технологии, на-

правленные на сохранение генетического разнообразия диких видов этого отряда, применялись, чаще всего, по отношению к кошачьим, псовым, куньим и медвежьим. Лишь на кошачьих успешно применяли криоконсервацию в отношении как эмбрионов, так сперматозоидов и ооцитов диких видов этого семейства. В отношении диких представителей семейства псовых криоконсервацию успешно применяли по отношению к сперматозоидам и ооцитам. Что касается диких видов медвежьих и куньих, то в отношении этих семейств криоконсервацию применяли лишь на сперматозоидах. В целом, эффективность криоконсервации гамет и эмбрионов хищных ниже, чем для большинства лабораторных и сельскохозяйственных видов животных. Для многих видов хищных протоколы криоконсервации репродуктивных клеток, на сегодняшний день, вообще отсутствуют.

Электроэякуляция, на сегодняшний день, является наиболее универсальным приемом получения семени у диких представителей отряда хищных. Между тем объем эякулята, концентрации сперматозоидов, процент тератоспермии может существенно отличаться у разных видов даже в пределах одного семейства. Соответственно, используют разные подходы, в случае если семени достаточно много, применяют ИО, если имеется ограниченное число сперматозоидов, то используют классическое ЭКО, либо осуществляют ИКСИ, если качество мужских гамет плохое или сперматозоидов очень мало.

В настоящее время не существует единого протокола криоконсервации или универсальной криопротекторной смеси, которая могла бы позволить одинаково успешно замораживать репродуктивные клетки всех видов хищных вне зависимости от принадлежности к тому или иному семейству. Анализ опубликованных работ позволяет сделать заключение о том, что внутри отряда хищных существуют межвидовые различия, которые могут повлиять на эффективность криоконсервации гамет и преимплантационных эмбрионов. Наличие доместицированных видов, как в случае кошачьих, псовых и куньих существенно облегчает подбор наиболее эффективных репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов для диких видов этих семейств.

Наибольший прогресс среди диких видов хищных достигнут в области криоконсервации сперматозоидов, о чем свидетельствует большое число опубликованных статей. Гораздо меньше успешных работ по криоконсервации преимплантационных эмбрионов диких видов хищных, причем, даже в случае успеха, эти работы, как правило, были выполнены лишь единожды. Что касается ооцитов, то, на сегодняшний день,

успешных работ по их криоконсервации у хищных лишь единицы. Одной из важных причин этого состоит в том, что клетки преимплантационных эмбрионов и ооцитов всех видов отряда хищных имеют повышенное содержание внутриклеточных липидов, что усложняет процесс их успешной криоконсервации. Роль внутриклеточных липидов в развитии ооцитов и эмбрионов активно изучают на разных моделях. Между тем, необходимы дополнительные эксперименты для понимания роли внутриклеточных липидов в ходе криоконсервации ооцитов и эмбрионов хищных.

В целом, можно заключить, что благодаря прогрессу репродуктивных технологий, их применение является перспективным подходом к сохранению генетических ресурсов и решения репродуктивных проблем некоторых представителей отряда Carnivora. Криоконсервация сперматозоидов уже на сегодняшний день применяется в программах, направленных на сохранение некоторых уязвимых и исчезающих видов хищных и восполнение генетического разнообразия существующих популяций *ex situ*. Между тем, требуется дополнительные эксперименты на доступных экспериментальных моделях, в частности, на домашней кошке, собаке и хорьке, направленные на разработку эффективных протоколов криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов диких видов хищных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90093), а также бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (проект № АААА-А19-119100290012-8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.И. Мокроусова и Е.Ю. Брусенцев ответственны за подготовку раздела “Криоконсервация сперматозидов представителей отряда хищных”, а также подготовку таблиц; С.В. Окотруб и В.А. Напримеров ответственны за подготовку раздела “Криоконсервация ооцитов и преимплантационных эмбрионов представителей отряда хищных”; С.Я. Амстиславский участвовал в написании всех разделов и осуществлял общую редакцию статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amstislavsky S., Brusençev E.YU., Okotrub K.A., Różkova I.H.* Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 2. С. 47–59.
- Brusençev E.YU., Чуйко Э.А., Okotrub K.A., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Раннева С.В., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я.* Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24. № 5. С. 533–538.
- Brusençev E.YU., Мокроусова В.И., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Амстиславский С.Я.* Роль липидных гранул в развитии ооцитов и эмбрионов млекопитающих // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 5. С. 297–305.
- Kuleshova L.G., Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф.* Проницаемость плазматических мембран, изолированных гепатоцитов крыс для молекул диметилсульфоксида // Биофизика. 2014. Т. 59. № 3. С. 474–480.
- Aardema H., van Tol H.T.A., Wubbolts R.W., Brouwers J.F.H.M., Gadella B.M., Roelen B.A.J.* Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress // Biol. Reprod. 2017. V. 96. № 5. P. 982–992.
- Agca Y.* Genome resource banking of biomedically important laboratory animals // Theriogenology. 2012. V. 78. P. 1653–1665.
- Andraszek K., Banaszewska D., Szeleszczuk O., Kuchta-Gładysz M., Grzesiakowska A.* Morphometric characteristics of the spermatozoa of blue fox (*Alopex lagopus*) and silver fox (*Vulpes vulpes*) // Animals. 2020. V. 10. 1927.
- Ambarlı H., Ertürk A., Soyumert A.* Current status, distribution, and conservation of brown bear (Ursidae) and wild canids (gray wolf, golden jackal, and red fox; Canidae) in Turkey // Turkish J. Zoology. 2016. V. 40. № 6. P. 944–956.
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P.* Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // Biopreserv. Biobank. 2019. V. 17. № 1. 76–83.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al.* Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) // Reprod. Domest. Anim. 2018. V. 53. № 5. P. 1219–1226.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.* Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // Reprod. Domest. Anim. 2012. V. 47. № 1. P. 164–175.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J., Kennedy M.W.* Conservation of the European mink (*Mustela lutreola*): focus on reproduction and reproductive technologies // Reprod. Domest. Anim. 2008. V. 43. № 4. P. 502–513.
- Anel-Lopez L., Ortega-Ferrusola C., Alvarez M. et al.* Improving sperm banking efficiency in endangered species through the use of a sperm selection method in brown bear (*Ursus arctos*) thawed sperm // BMC Vet. Res. 2017. V. 13. № 1. P. 200.
- Apparicio M., Ruggeri E., Luvoni G.C.* Vitrification of immature feline oocytes with a commercial kit for bovine embryo vitrification // Reprod. Domest. Anim. 2013. V. 48. № 2. P. 240–244.
- Bateman H.L., Swanson W.F.* Interaction of extender composition and freezing method for effective semen cryopreservation in the North American river otter (*Lutra canadensis*) // Theriogenology. 2017. V. 101. P. 26–34.
- Baudi D.L.K., Jewgenow K., Pukazhenth B.S. et al.* Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*) // Theriogenology. 2008. V. 69. № 2. P. 204–211.
- Bjorndahl L., Soderlund I., Kvist U.* Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment // Hum. Reprod. 2003. V. 18. № 4. P. 813–816.
- Boutelle S., Lenahan K., Krisher R., Bauman K.L., Asa C.S., Silber S.* Vitrification of oocytes from endangered Mexican gray wolves (*Canis lupus baileyi*) // Theriogenology. 2011. V. 75. № 4. P. 647–654.
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V. et al.* Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // Theriogenology. 2018. V. 110. P. 148–152.
- Buranaamnuay K.* Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review // Anim. Reprod. Sci. 2017. V. 183. P. 56–65.
- Cai Z.G., An J.H., Liu Y.L. et al.* Single layer centrifugation improves the quality of frozen-thawed sperm of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) // Anim. Reprod. Sci. 2018. V. 195. P. 58–64.
- Cao X., Li J., Xue H. et al.* Effect of vitrification on meiotic maturation, mitochondrial distribution and glutathione synthesis in immature silver fox cumulus oocyte complexes // Theriogenology. 2017. V. 91. P. 104–111.
- Chastant-Maillard S., Viaris de Lesegno C., Chebrout M. et al.* The canine oocyte: uncommon features of *in vivo* and *in vitro* maturation // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23. № 3. P. 391–402.
- Chatdarong K.* Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa // Reprod. Dom. Anim. 2017. V. 52. P. 261–264.

- Chequeman C., Faundez R., Sanchez R., Risopatron J.* Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa // *Andrologia*. 2018. V. 50. № 9. e13080.
- Cocchia N., Ciani F., El-Rass R. et al.* Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction // *Zygote*. 2009. V. 18. P. 1–8.
- Comizzoli P., Holt W.V.* Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species // *Biol. Reprod.* 2019. V. 101. № 3. P. 514–525.
- Comizzoli P., Holt W.V.* Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. Reproductive sciences in animal conservation, advances in experimental medicine and biology / Eds. Holt W.V., et al. N.Y.: Springer Science, 2014. 753. P. 331–356.
- Conforti V., Adania C.H., Gonzalez P.G. et al.* Novel recipient synchronization regimens for successful embryo transfer in the Brazilian ocelot following long-term frozen embryo storage // *Reprod. Fertil. Dev.* 2008. V. 21. № 1.
- Crichton E.G., Bedows E., Miller-Lindholm A.K. et al.* The efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) // *Biol. Reprod.* 2003. V. 68. P. 105–113.
- Damiani P., Gomez M.C., Cole A. et al.* The production of intracytoplasmic sperm injection lion (*Panthera leo*) embryos using spermatozoa collected by percutaneous epididymal sperm aspiration from vasectomized males // *Reprod. Fertil. Dev.* 2003. V. 16. № 2. P. 223–224.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S. et al.* Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro* // *Reproduction*. 1992. V. 96. № 2. P. 555–564.
- Dresser B.L., Gelwicks E.J., Wachs K.B., Keller G.L.* First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring // *J. Exp. Zool.* 1988. V. 246. № 2. P. 180–186.
- Elliott G.D., Wang S., Fuller B.J.* Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures // *Cryobiology*. 2017. V. 76. P. 74–91.
- Erdmann R.H., Blank M.H., Ribeiro R.N. et al.* Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: Effects of different extenders and frozen protocols // *Theriogenology*. 2019. V. 143. P. 27–34.
- Fernandez-Gonzalez L., Hribal R., Stagegaard J., Zahmel J., Jewgenow K.* Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after *in vitro* maturation of oocytes and ICSI // *Theriogenology*. 2015. V. 83. № 6. P. 995–999.
- Franklin A.D., Waddell W.T., Goodrowe K.L.* Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature // *Theriogenology*. 2018. V. 116. P. 41–48.
- Galiguis J., Gomez M.C., Leibo S.P., Pope C.E.* Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized *in vitro* matured oocytes // *Cryobiology*. 2014. V. 68. № 3. P. 459–466.
- Ganan N., Gonzalez R., Garde J.J. et al.* Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) // *Reprod. Fertil. Devel.* 2009a. V. 21. № 7. P. 848–859.
- Ganan N., Gonzalez R., Sestelo A. et al.* Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*) // *Theriogenology*. 2009b. V. 72. № 3. P. 341–352.
- Gomez M.C., Pope E., Harris R., Mikota S., Dresser B.L.* Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer // *Theriogenology*. 2003. V. 60. № 2. P. 239–251.
- Guaitolini C.R., Taffarel M.O., Teixeira N.S., Sudano M.J., Freitas P.M., Lopes M.D., Landin-Alvarenga Fda C., de Oliveira C.A., Luz M.R.* Post-thaw viability of *in vivo*-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing // *Theriogenology*. 2012. V. 78. № 3. P. 576–582.
- Gundu E.G., Adia J.E.* Conservation methods of endangered species // *J. Res. Fores. Wildl. Envir.* 2014. V. 6. № 2. P. 76–83.
- Guraya S.S.* A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog // *J. Exp. Zool.* 1965. V. 160. № 1. P. 123–135.
- Ha A.N., Jo A.R., Kim Y.G. et al.* Establishment of cryopreservation of leopard cat semen collected by electro-ejaculation method // *J. Emb. Trans.* 2011. V. 26. № 4. P. 245–250.
- Hori T., Ushijima H., Kimura T. et al.* Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method // *J. Vet. Med. Sci.* 2016. V. 78. № 7. P. 1137–1143.
- Howard J.G., Lynch C., Santymire R., Marinari P., Wildt D.E.* Recovery of gene diversity using long-term, cryopreserved spermatozoa in the endangered black-footed ferret // *Anim. Conserv.* 2015. V. 19. P. 102–111.
- Howard J.G., Wildt D.E.* Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids // *Theriogenology*. 2009. V. 71. P. 130–148.
- <https://www.canids.org/5/>
- <https://www.iucn.org/>
- <https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=100041&searchType=species>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/www-tax.cgi>
- Hwang I.S., Hochi S.* Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 570647.
- Ishigaki M., Kawasaki S., Ishikawa D., Ozaki Y.* Near-infrared spectroscopy and imaging studies of fertilized fish

- eggs: *in vivo* monitoring of egg growth at the molecular level // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20066.
- Jalkanen L.* Sperm abnormalities in silver fox (*Vulpes vulpes*) semen selected for artificial insemination // *J. Reprod. Fertil.* 1993. P. 287–290.
- Jara B., Merino O., Sanchez R., Risopatron J.* Positive effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the quality of cryopreserved cat spermatozoa // *Cryobiology*. 2019. V. 89. P. 76–81.
- Jayaprakash D., Patil S.B., Kumar M.N., Majumdar K.C., Shivaji S.* Semen characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus* // *Journal of Andrology*. 2001. V. 22. № 1. P. 25–33.
- Jeong D.H., Kim J.H., Na K.J.* Characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization // *Theriogenology*. 2018. V. 119. P. 91–95.
- Johnson A.E., Freeman E.W., Wildt D.E., Songsasen N.* Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hyper-sensitivity to osmotic and freezing-induced injury, but respond favorably to dimethyl sulfoxide // *Cryobiology*. 2014. V. 68. № 3. P. 361–370.
- Johnston L.A., Donoghue A.M., Igo W., Simmons L.G., Wildt D.E., Rieffenberger J.* Oocyte recovery and maturation in the American black bear (*Ursus americanus*): a model for endangered ursids // *J. Exp. Zool.* 1994. V. 269. P. 53–61.
- Karja N.W.K., Fahrudin M., Agus Setiadi M. et al.* Characteristics and fertility of sumatran tiger spermatozoa cryopreserved with different sugars // *Cryoletters*. 2016. V. 37. № 4. P. 264–271.
- Karpagina Y.A., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V.* Cryoprotectant redistribution along the frozen straw probed by Raman spectroscopy // *Cryobiology*. 2016. V. 72. № 2. P. 148–153.
- Kheirkhah M.S., Mollapour Sisakht M., Mohammadsadegh M., Moslemi H.R.* Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration // *Theriogenology*. 2017. V. 91. P. 17–20.
- Kim S.* Oocyte biology in fertility preservation. Vitrification of oocytes: from basic science to clinical application // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. V. 761. Chapter 6. P. 69–83.
- Kochan J., Nizanski W., Moreira N. et al.* ARTs in Wild Felid Conservation Programmes in Poland and in the World // *J. Vet. Res.* 2019. V. 63. № 3. P. 457–464.
- Komatsu K., Iwasaki T., Murata K. et al.* Morphological reproductive characteristics of testes and fertilization capacity of cryopreserved sperm after the Fukushima accident in raccoon (*Procyon lotor*) // *Reprod. Domest. Anim.* 2021. V. 56. № 3. P. 484–497.
- Lamberski N.* Felidae // *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*. 2015. V. 8. P. 467–476.
- Larson J.L., Miller D.J.* Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species // *Mol. Reprod. Dev.* 1999. V. 52. № 4. P. 445–449.
- Leibo S.P., Songsasen N.* Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species // *Theriogenology*. 2002. V. 57. P. 303–326.
- Lindeberg H., Aalto J., Amstislavsky S. et al.* Surgical recovery and successful surgical transfer of conventionally frozen-thawed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // *Theriogenology*. 2003. V. 60. № 8. P. 1515–1525.
- Luciano A.M., Chigioni S., Lodde V., Franciosi F., Luvoni G.C., Modina S.C.* Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes // *Cryobiology*. 2009. V. 59. № 1. P. 90–95.
- Lueders I., Ludwig C., Schroeder M., Mueller K., Zahmel J., Dehnhard M.* Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*) // *J. Zoo. Wildl. Med.* 2014. V. 45. № 2. P. 372–379.
- Lueders I., Luther I., Scheepers G., van der Horst G.* Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*) // *Theriogenology*. 2012. V. 78. № 3. P. 696–701.
- Luther I., Jakop U., Lueders I. et al.* Semen cryopreservation and radical reduction capacity of seminal fluid in captive African lion (*Panthera leo*) // *Theriogenology*. 2017. V. 89. P. 295–304.
- Luvoni G.C.* Gamete cryopreservation in the domestic cat // *Theriogenology*. 2006. V. 66. № 1. P. 101–111.
- Luvoni G.C., Pellizzari P.* Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages // *Theriogenology*. 2000. V. 53. № 8. P. 1529–1540.
- Macente B.I., Gutierrez R.R., Apparicio M. et al.* Cat epididymal semen cryopreserved with and without vitamin E: effect on sperm parameters and lipid peroxidation // *Anim. Reprod. AR*. 2018. V. 15. № 4. P. 1193–1198.
- Mastromonaco G.F., Songsasen N.* Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species // *Reproductive Technologies in Animals*. 2020. pp. 99–117.
- Mazur P.* Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.* 1990. V. 17. № 1. P. 53–92.
- Mikolajewska N., Muller K., Nizanski W., Jewgenow K.* Vitrification of domestic cat oocytes—effect on viability and integrity of subcellular structures // *Reprod. Domest. Anim.* 2012. V. 47. P. 295–299.
- Minter L.J., DeLiberto T.J.* Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa // *Theriogenology*. 2005. V. 64. № 9. P. 1898–1912.
- Mokrousova V.I., Okotrub K.A., Brusentsev E.Yu. et al.* Effects of slow freezing and vitrification on viability in

- domestic cat embryos // Reprod. Dom. Anim. 2020a. V. 55. P. 1328–1336.
- Mokrousova V.I., Okotrub K.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V.* Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // Cryobiology. 2020b. V. 95. P. 177–182.
- Moro L.N., Sestelo A.J., Salamone D.F.* Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes // Reprod. Dom. Anim. 2014. V. 49. № 4. P. 693–700.
- Nagashima J.B., Sylvester S.R., Nelson J.L. et al.* Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by *in vitro* fertilization // PLoS One. 2015. V. 10. № 12. e0143930.
- Nowak A., Kochan J., Prochowska S., Partyka A., Młodawska W., Witarski W., Skotnicki J., Grega T., Pałys M., Nizanski W.* The viability of serval (*Leptailurus serval*) and pallas cat (*Felis manul*) oocytes after cryopreservation using the Rapid-I method // Cryo Letters. 2019. V. 40. № 4. P. 226–230.
- Nunez-Martinez I., Moran J.M., Pena F.J.* A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation // Reprod. Domest. Anim. 2006. V. 41. № 5. P. 408–415.
- Ochota M., Nizanski W.* Effect of vitrification on apoptotic changes in feline embryos // Czech. J. Anim. Sci. 2018. V. 63. P. 144–151.
- Okano T., Murase T., Yayota C. et al.* Characteristics of captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) semen collected by electroejaculation with different voltages for stimulation and frozen-thawed under different conditions // Anim. Reprod. Sci. 2006. V. 95. № 1–2. P. 134–143.
- Okotrub K.A., Mokrousova V.I., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V.* Lipid droplet phase transition in freezing cat embryos and oocytes probed by Raman spectroscopy // Biophys. J. 2018. V. 115. № 3. 577–587.
- Pederson M.J., Watson C.A., Blevins B.A., Loskutoff N.M.* Domestic cat (*Felis catus*) embryo cryopreservation: slow-slowing versus vitrification // Reprod. Fertil. Dev. 2009. V. 21. P. 180.
- Piltti K., Lindeberg H., Aalto J., Korhonen H.* Live cubs born after transfer of OPS vitrified-warmed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // Theriogenology. 2004. V. 61. № 5. P. 811–820.
- Polge C., Smith A.U., Parkes A.S.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // Nature. 1949. V. 164. P. 666.
- Pope C.E.* Aspects of *in vivo* oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat // Theriogenology. 2014. V. 81. P. 126–137.
- Pope C.E., Gomez M.C., Galiguis J., Dresser B.L.* Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats // Reprod. Dom. Anim. 2012. V. 47. P. 125–129.
- Pope C.E., Crichton E.G., Gomez M.C., Dumas C., Dresser B.L.* Domestic cat kittens born after transfer of cryopreserved embryos produced by *in vitro* fertilization of oocytes with flow sorted sperm // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23. P. 148.
- Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L.* *In vitro* embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats // Theriogenology. 2006. V. 66. № 6–7. P. 1518–1524.
- Pope C.E.* Embryo technology in conservation efforts for endangered felids // Theriogenology. 2000. V. 53. P. 163–174.
- Pukazhenth B.S., Neubauer K., Jewgenow K., Howard J.G., Wildt D.E.* The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives // Theriogenology. 2006. V. 66. P. 112–121.
- Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J.* Myoinositol supplementation of freezing medium improves the quality-related parameters of dog sperm // Animals (Basel). 2019. V. 9. № 12. pii: E1038.
- Rajan R., Matsumura K.* Development and application of cryoprotectants // Adv. Exp. Med. Biol. 2018. V. 1081. P. 339–354.
- Rall W.F., Fahy G.M.* Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 degrees C by vitrification // Nature. 1985. V. 313. № 6003. P. 573–575.
- Ramu S., Jeyendran R.S.* The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity // Spermatogenesis. N.J.: Totowa. Humana Press, 2013. P. 21–25.
- Ranneva S.V., Okotrub K.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V.* Deuterated stearic acid uptake and accumulation in lipid droplets of cat oocytes // Arch. Biochem. Biophys. 2020. V. 692. P. 108532.
- Regehr E.V., Laidre K.L., Akçakaya H.R., Amstrup S.C., Atwood T.C., Lunn N.J., Obbard M., Stern H., Thiemann G.W., Wiig O.* Conservation status of polar bears (*Ursus maritimus*) in relation to projected sea-ice declines // Biol. Lett. 2016. V. 12. № 12. P. 20160556.
- Rodrigues da Paz R.S., dos Santos Avila H.B.* Coatis (*Nasua nasua*) semen cryopreservation // Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2015. V. 52. № 2. P. 151–157.
- Saragusty J., Arav A.* Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // Reproduction. 2011. V. 141. № 1. P. 1–19.
- Sestelo A.J., Rodriguez M.D., Ganan N. et al.* Functionality evaluation of two extenders for *Leopardus geoffroyi* sperm cryopreservation by interspecific IVF with domestic cat oocytes // Reprod. Fertil. Devel. 2018. V. 31. № 1. P. 178–179.
- Shaw J.M., Jones G.M.* Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos // Hum. Reprod. Update. 2003. V. 9. № 6. P. 583–605.
- Sichtar J., Simonik O., Folkova P. et al.* The quality of frozen-thawed canine semen with respect to semen extender composition and sequence of ejaculate collection in

- dogs // Act. Univ. Agricult. Silvicult. Mend. Brun. 2015. V. 64. P. 169–175.
- Silva H.V.R., Nunes T.G.P., Brito B.F. et al.* Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*) // Cryobiology. 2019. pii: S0011-2240(19)30195-6.
- Stasiak K., Glogowski J., Demianowicz W. et al.* Use of biochemical markers to evaluate the quality of fresh and cryopreserved semen from the arctic fox (*Vulpes lagopus*) // Pol. J. Vet. Sci. 2014. V. 17. № 3. P. 427–432.
- Stoops M.A., Bond J.B., Bateman H.L. et al.* Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*) // Reprod. Fertil. Devel. 2007. V. 19. № 5. P. 685–694.
- Sun X., Li Z., Yi Y. et al.* Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique // Biol. Reprod. 2008. V. 79. № 5. P. 832–840.
- Swanson W.F., Stoops M.A., Magarey G.M., Herrick J.R.* Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of *in situ-ex situ* populations // Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007. V. 65. P. 417–423.
- Swanson W.F.* Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids // ILAR J. 2003. V. 44. P. 307–316.
- Terrell K.A., Wildt D.E., Anthony N.M. et al.* Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa // Cryobiology. 2012. V. 64. № 2. P. 110–117.
- Tipkantha W., Thuwanut P., Morrell J., Comizzoli P., Chatdarong K.* Influence of living status (single vs. paired) and centrifugation with colloids on the sperm morphology and functionality in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) // Theriogenology. 2016. V. 86. № 9. P. 2202–2209.
- Thuwanut P., Tipkantha W., Siriaroonrat B., Comizzoli P., Chatdarong K.* Beneficial effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate treatment on the Indochinese leopard (*Panthera pardus delacouri*) sperm quality after cryopreservation // Reprod. Dom. Anim. 2017. V. 52. P. 269–274.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Bergqvist A.S. et al.* The effects of antioxidants on semen traits and *in vitro* fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*) // Theriogenology. 2011. V. 76. № 1. P. 115–125.
- Tsujioka T., Otzdorff C., Braun J., Hocki S.* Effect of post-IVF developmental kinetics on *in vitro* survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts // Reprod. Dom. Anim. 2008. V. 43. № 3. P. 323–327.
- Turathum B., Roytrakul S., Changsangfa C. et al.* Missing and overexpressing proteins in domestic cat oocytes following vitrification and *in vitro* maturation as revealed by proteomic analysis // Biol. Res. 2018. V. 51. № 1. P. 27.
- Turathum B., Saikhun K., Sangsuwan P., Kitayananit Y.* Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes // Reprod. Biol. Endocrinol. 2010. V. 8. P. 70.
- Vajta G., Rienzi L., Ubaldi F.M.* Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos // Reprod. Biomed. Online. 2015. V. 30. № 4. P. 325–333.
- Van den Berghe F., Paris M.C.J., Briggs M.B., Farstad W.K., Paris D.B.B.P.* A two-step dilution tris-egg yolk extender containing Equex STM significantly improves sperm cryopreservation in the African wild dog (*Lycaon pictus*) // Cryobiology. 2018. V. 80. P. 18–25.
- Van der Horst G., Kitchin R.M., van der Horst M., Atherton R.W.* The effect of the breeding season, cryopreservation and physiological extender on selected sperm and semen parameters of four ferret species: implications for captive breeding in the endangered black-footed ferret // Reprod. Fertil. Dev. 2009. V. 21. № 2. P. 351–363.
- Vansandt L.M., Moresco A., Gonzalez R. et al.* Sperm cryopreservation with a soy lecithin-based medium in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*) // Reprod. Fertil. Devel. 2018. V. 31. P. 177–177.
- Vansandt L.M., Bateman H.L., Newsom J., Swanson W.F.* Getting the yolk out: the use of a soy lecithin-based cryomedium for semen banking in the pallas' cat and fishing cat // Reprod. Fertil. Devel. 2016. V. 29. № 1. P. 165–166.
- Veprinsev B.N., Rott N.N.* Conserving genetic resources // Nature. 1979. V. 280. P. 633–634.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P.* Survival of mouse embryos frozen to –196 degrees and –269 degrees C // Science. 1972. V. 178. № 4059. P. 411–414.
- Wildt D.E., Roth T.L.* Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids // Int. Zoo Yb. 1997. V. 35. P. 164–172.
- Wildt D., Monfort S., Donoghue A., Johnston L., Howard J.* Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo // Theriogenology. 1992. V. 37. P. 161–184.
- Wood T.C., Wildt D.E.* Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro* // J. Reprod. Fertil. 1997. V. 110. № 2. P. 355–360.
- Yatu M., Sato M., Kobayashi J. et al.* Collection and frozen storage of semen for artificial insemination in red foxes (*Vulpes vulpes*) // J. Vet. Med. Sci. 2018. V. 80. № 11. P. 1762–1765.
- Yin X.J., Lee H.S., Choi E.G., Yu X.F., Park G.Y., Bae I., Yang C.J., Oh D.H., Kim N.H., Kong I.K.* In vitro maturation of oocytes derived from the brown bear (*Ursus arctos*) // J. Reprod. Dev. 2007. V. 53. № 3. P. 685–690.
- Zambelli D., Cunto M.* Semen collection in cats: techniques and analysis // Theriogenology. 2006. V. 66. № 2. P. 159–165.
- Zindl C., Asa C.S., Gunzel-Apel A.R.* Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C. l. baileyi*) // Theriogenology. 2006. V. 66. № 6–7. P. 1797–1802.

Application of the Cryobank Concept to Wild and Endangered Carnivora Species

S. Ya. Amstislavsky^{1,*}, V. I. Mokrousova¹, S. V. Okotrub^{1,2},
E. Yu. Brusentsev¹, and V. A. Naprimerov^{1,3}

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. Lavrenteva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk National Research State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Novosibirsk State Agrarian University, ul. Dobrolubova 160, Novosibirsk, 630037 Russia*

*e-mail: amstis@yandex.ru

The main achievements and problems of gametes and preimplantation embryos cryobanking for vulnerable and endangered Carnivora species are described. In particular, cryopreservation of Carnivora species oocytes and embryos is complicated by the abundance of lipid droplets. The review focuses on Felidae, Canidae, Mustelidae and Ursidae because valuable experience has been gained in the application of modern achievements in reproductive biology for these families aiming to preserve the genetic resources of nondomesticated species, including endangered ones. For comparison, basic studies are presented on domesticated members of these families: the cat, the dog and the domestic ferret. The specific reproductive biological features, which characterize these families, were taken into account.

Keywords: endangered species, felids, canids, mustelids, ursids, spermatozoa, oocytes, preimplantation embryos, genetic resources, cryopreservation

ДЕАЦЕТИЛАЗЫ ГИСТОНОВ В ПРОЦЕССЕ РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК ГУБКИ *HALISARCA DUJARDINII*

© 2021 г. О. И. Кравчук^{a, *}, А. В. Бураков^b, Н. Г. Горностаев^a, К. В. Михайлов^{b, c},
К. И. Адамейко^a, А. Д. Финошин^a, А. А. Георгиев^d, В. С. Михайлов^a, Ю. Э. Ерюкова^d,
Г. А. Рубиновский^e, Д. В. Заиш^f, Г. Р. Газизова^g, О. А. Гусев^{g, h},
Е. И. Шагимарданова^g, Ю. В. Люпина^a

^aИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Ленинские горы, 1, стр. 40, Москва, 119991 Россия

^cИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук,
Большой Картеный, 19, стр. 1, Москва, 127051 Россия

^dМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

^eРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

^fПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, 119991 Россия

^gКазанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

^hDepartment of Regulatory Transcriptomics for Medical Diagnostics, Juntendo University, Tokyo, 113-8421 Japan

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021 г.

После доработки 30.04.2021 г.

Принята к публикации 10.05.2021 г.

Одной из наиболее распространенных эпигенетических модификаций белков у эукариот является ацетилирование/деацетилирование лизина. Гистоновые деацетилазы (HDACs) снижают уровень ацетилирования гистонов, что приводит к подавлению транскрипции. У позвоночных животных хорошо задокументировано участие гистоновых деацетилаз в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, эмбриональном развитии, возникновении и прогрессии злокачественных опухолей. У базальных многоклеточных животных механизмы регуляции экспрессии генов, связанные с активностью гистоновых диацетилаз, не изучены. Однако известно, что процесс реагрегации клеток губок сопровождается их дедифференцировками и трансдифференцировками, что может указывать на вовлеченность диацетилаз в регуляцию этого процесса. Целью нашей работы было изучение экспрессии гистоновых диацетилаз у губки *Halisarca dujardinii* (*Demospongia*). На основе анализа транскриптомов губки *H. dujardinii* и генома губки *Amphimedon queenslandica* (*Demospongia*) мы идентифицировали представителей всех классов Zn²⁺-зависимых HDACs губок. Был проведен анализ дифференциальной экспрессии HDAC в суспензии клеток губки *H. dujardinii* после диссоциации ее тела и в агрегатах после 24 ч реагрегации. Было исследовано дозозависимое влияние двух селективных ингибиторов HDAC класса I (бутират натрия и вальпроевой кислоты) на процесс реагрегации клеток. Показано, что добавление селективных ингибиторов HDAC класса I в инкубационную среду при реагрегации приводит к изменению морфологических характеристик клеточных агрегатов губки. Можно предположить, что участие гистоновых деацетилаз в регуляции трансдифференцировки клеток является эволюционно древним механизмом, использовавшимся многоклеточными животными еще до становления тканевой организации.

Ключевые слова: *Halisarca dujardinii*, Porifera, Demospongia, трансдифференцировка клеток, диссоциация клеток, реагрегация клеток, гистоновые деацетилазы, транскриптом

DOI: 10.31857/S0475145021050050

ВВЕДЕНИЕ

Система регуляции генной экспрессии имеет ключевое значение для процесса дифференцировки клеток. Механизмы активации и репрес-

ции генов хорошо изучены у модельных видов из группы билатерально-симметричных животных, но недостаточно у низших многоклеточных. Губки (Porifera), одни из самых эволюционно древ-

них ныне существующих многоклеточных животных. Тело губок образовано несколькими типами клеток. Пластичность клеток – главная особенность губок. В отличии от других многоклеточных животных, клетки тела губок в течение всей жизни находятся в процессе постоянного движения и трансдифференцировки, связанными, в частности, с непрерывной реорганизацией водоносной системы (Ereskovsky et al., 2013; Lavrov, Kosevich, 2014; Sogabe et al., 2019).

Одной из форм проявления пластичности является способность клеток губок к формированию многоклеточных агрегатов после диссоциации тела губки (Ereskovsky et al., 2021). В начальной стадии реагрегации отдельные клетки губок приобретают округлую форму. Далее клетки слипаются и образуют многоклеточные агрегаты, не имеющие правильной формы (Sipkema et al., 2003). Из агрегатов неправильной формы образуются примморфы – клеточные агрегаты округлой, почти сферической формы, покрытые пинакоцитами – уплощенными клетками, сходными с эпителиальными (Lavrov, Kosevich, 2014). Скорость реагрегации отличается у разных видов губок, но у всех видов агрегаты имеют вначале неправильную форму и небольшие размеры и правильную форму и большие размеры на более поздних ее этапах (Lavrov, Kosevich, 2014; Ereskovsky et al., 2021). Так, у губок класса Demospongiae агрегаты из 15–30 клеток формируются через 15–40 мин после диссоциации тела губки, а через 2–4 ч после диссоциации агрегаты достигают размеров сотен микрометров (Lavrov, Kosevich, 2014). Реагрегация сопровождается активной миграцией клеток, многочисленными клеточными дедифференцировками и трансдифференцировками (Lavrov, Kosevich, 2014; Ereskovsky et al., 2016). Несмотря на то, что процесс реагрегации описан в 1907 г. (Wilson, 1907), до сих пор остается неясным, как происходит трансдифференцировка клеток губок во время этого процесса (Adamska, 2018). Можно предположить, что определенную роль в регуляции клеточных трансдифференцировок в ходе реагрегации у губок играют эпигенетические модификации белков.

Известно, что при формировании различных клеточных линий из плорипotentных клеток происходит активация одних генов и репрессия других с помощью эпигенетических меток. Ацетилирование лизина является одной из наиболее распространенных эпигенетических модификаций белков в эукариотических клетках. Ацетилирование и деацетилирование находится под контролем гистоновых ацетилтрансфераз (histone acetyltransferases, HATs) и гистоновых деацетилаз (histone deacetylases, HDACs). Ацетилирование лизина в гистонах приводит к созданию участков открытого хроматина и, следовательно, повышению транскрипции генов. HDACs снижают уро-

вень ацетилирования гистонов и тем самым приводят к компактизации хроматина и подавлению транскрипции (Pazin, Kadonaga, 1997). Помимо лизинов гистонов HDACs способны деацетилировать лизины в других белках (в частности, компонентах транскрипционных комплексов), изменяя различные биологические процессы в клетке. Таким образом, взаимодействие HATs и HDACs обеспечивает динамический гомеостаз клеточных белков. Показано участие HDACs в регуляции пролиферации и дифференцировки, эмбриональном развитии, возникновении и прогрессии злокачественных опухолей (Choi et al., 2001; Lagger, 2002; Sjöblom et al., 2006; Wilson et al., 2006; Montgomery et al., 2007; Bhaskara et al., 2008; Marks, 2010). Различные HDACs в клетках эукариот разделяют на 4 основных класса: три из них – Zn²⁺-зависимые (I, II, IV) и один – NAD⁺ зависимый (III). Одним из эффективных методов исследования функции HDACs в клетках является использование специфических ингибиторов. В настоящее время известно большое количество фармакологических ингибиторов, действующих либо на определенные, либо на все HDACs. Одна из групп ингибиторов HDACs, созданная на основе солей жирных кислот, блокирует в основном деацетилазы класса I (Silva et al., 2018) и широко применяются для изучения функции этих ферментов у позвоночных. Бутират натрия (NaBu) и вальпроевая кислота (VPA) – соли жирных кислот, ремоделирующие структуру хроматина, вызывающие гиперацетилирование гистонов, влияющие на экспрессию большого количества генов, в том числе, генов плорипотенции: *sox2*, *oct4*, *klf4*, *c-myc*, *DPPA2*, *DPPA3*, *DPPA4*, *DPPA5*, *NANOG*, клеточный цикл и дифференцировку клеток (табл. 1). Ингибиторы HDACs NaBu и VPA применяются при получении индуцированных плорипотентных клеток (D'Anna et al., 1980; Huangfu et al., 2008; Liang et al., 2010; Mali et al., 2010; Chen et al., 2013; Zhang, Wu, 2013; Mahapatra et al., 2017), а также при лечении некоторых типов рака (Louis et al., 2004; Wang et al., 2006; Michaelis et al., 2007; Marks, 2010; Tang et al., 2011; Terranova-Barberio et al., 2017; McClure et al., 2018; Tran et al., 2019; Heers et al., 2018). Многочисленные исследования с использованием NaBu и VPA были проведены на клетках позвоночных, которые являются сложными многоклеточными организмами с высоким уровнем дифференцировки клеток.

Насколько древней и эволюционно консервативной является регуляция дифференцировки клеток с помощью гистоновых деацетилаз? Ответ на этот вопрос может быть получен при изучении животных, филогенетически далеких от позвоночных и не имеющих настоящих тканей. Учитывая, что в ходе реагрегации клеток губок наблюдаются трансдифференцировки клеток (Lavrov 2016, 2020; Ereskovsky 2018, 2021), мы рассчитыва-

Таблица 1. Влияние NaBu и VPA на клетки в культуре

| | Клеточная линия, организм | Концентрация | Наблюдаемые эффекты | Литературный источник |
|------|---|---|--|-----------------------|
| NaBu | CHO, клетки яичника китайского хомячка | 1 мМ и выше, сила эффекта зависит от концентрации | Гиперацетилирование гистонов H2B, H3, H4. Снижается способность клеток переходить из G1 в S фазу | D'Anna et al., 1980 |
| | MCF7 и MCF7-A (устойчивая к адриамицину), инвазивная аденокарциномы протоков молочной железы человека | 1 мМ | Остановка клеточного цикла в G1 фазе | Fagot et al., 1994 |
| | KB-3-1 и KB-A (устойчивая к адриамицину), рак эпитеалальной ткани человека | 2 мМ 3 мМ | Остановка клеточного цикла в G1 и G2/M фазе Временное снижение экспрессии гена c-myc | Fagot et al., 1994 |
| | IMR90, фибробlastы человека | 0.5 мМ | Гиперацетилирование H3K9 гистона H3, усиление ДНК деметилирования. Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc, повышение экспрессии генов, связанных с плюрипотентией (<i>DPPA2</i> , <i>DPPA3</i> , <i>DPPA4</i> , <i>DPPA5</i> , и <i>NANOG</i>) | Mali et al., 2010 |
| | MEF, эмбриональные мышиные фибробlastы | 0.25–1 мМ | Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc | Liang et al., 2010 |
| | HFF, фибробlastы человека | 0.5 мМ | Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc. Повышение стабильности и повышение экспрессии микро-РНК miR302/367 кластера | Zhang, Wu, 2013 |
| | MEF, эмбриональные мышиные фибробlastы | 1 мМ | Спонтанная конверсия преиндуцированных стволовых плюрипотентных клеток (pre-iPSCs) в iPSCs, повышение экспрессии в pre-iPSCs клетках p15, p21, p53, Nanog, Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc | Kang et al., 2014 |
| | MAC-T, бычий эпителиальный клетки молочной железы | От 0 до 5 мМ | Гиперацетилирование H3K9/14, H3K18 и H3K27 гистона H3; селективное ингибиование HDAC2, 3 и 8 (при концентрации выше 1 мМ) | Silva et al., 2018 |

Таблица 1. Окончание

| | Клеточная линия, организм | Концентрация | Наблюдаемые эффекты | Литературный источник |
|-----|--|----------------|---|--|
| VPA | IMR90, фибробласты человека | 1 мМ | Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc. Повышение экспрессии генов, связанных с плюрипотенцией (<i>DPPA2</i> , <i>DPPA3</i> , <i>DPPA4</i> , <i>DPPA5</i> , и <i>NANOG</i>). Эффект слабее, чем в случае NaBu | Mali et al., 2010 |
| | MEF, эмбриональные мышиные фибробласты | 2 мМ | Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием 4 ТФ (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) или 3 ТФ (Oct4, Sox2, Klf4) | Huangfu et al., 2008 |
| | HeLa, раковая опухоль шейки матки человека | От 0 до 5 мМ | Ингибирование деацетилазы HDAC1 (сила эффекта зависит от концентрации) | Phiel et al., 2001 |
| | Эмбрионы шпорцевой лягушки | 5 мМ | Тератогенный эффект (уменьшение размеров и нарушение развития эмбриона) | |
| | Neuro2A, мышиная нейробластома | 0, 2, 5 мМ | Активирует транскрипцию с различных промоторов при концентрации выше 2 мМ | |
| | 293T, эмбриональные почечные клетки человека | От 0 до 20 мМ | Активирует транскрипцию с различных промоторов при концентрации выше 2 мМ | |
| | P19, эмбриональная карцинома мышей | 0.1–1 мМ | Индукция дифференциации плюрипотентных клеток эмбриональной мышиной карциномы в скелетные миоциты. Активация транскрипции, специфичной для мышц (Pax3, MYOG и MyoD). | Chen et al., 2013 |
| | FNS (культура 328), мозг 9-недельного эмбриона человека | 1 мМ | Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc | Medvedev et al., 2011 |
| | Индуцированные плюрипотентные клетки человека (hiPS) bFFs, фетальные фибробласты буйвола (<i>Bubalus bubalis</i>) | 1 мМ 1.5 мМ | Повышение эффективности дифференциации hiPS в гепатоциты Повышение эффективности получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием ТФ Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc | Kondo et al., 2014 Mahapatra et al., 2017 |

ли приблизиться к ответу на данный вопрос за счет экспериментов на реагgregирующих клетках *H. dujardini*.

Целью настоящей работы было описание деацетилаз гистонов морской губки *H. dujardini* из класса

Demospongiae и исследование их экспрессии в ходе реагрегации диссоциированных клеток. Основным экспериментальным подходом являлось изучение реагрегации клеток губок в условиях подавления активности HDACs ингибиторами NaBu и VPA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы губок

Образцы губок *H. dujardinii* были собраны в сублиторальной зоне (0–2 м) в районе Беломорской биологической станции МГУ. Сборы губок осуществлялись в январе и ноябре. Ранее установлено, что на разных стадиях жизненного цикла процесс реагрегации клеток губки *H. dujardinii* имеет сходный паттерн, но отличается по темпам реагрегации (Lavrov et al., 2020). Температура воды в районе сбора в январе составляла 0–2°C, а в ноябре 5–6°C. Губок собирали с субстратом (водорослями) для сохранения микроокружения по 7–8 особей в 5 л аквариумах с природной морской водой, которые помещали в термобоксы с контролем температуры 1–4°C зимой и 5–8°C осенью и транспортировали в ИБР РАН. До экспериментов губки содержались на субстрате в 5 л аквариумах с природной морской водой при температуре 4–5°C зимой и 8–10°C осенью. Период адаптации составлял не более 5 дней до начала эксперимента (Finoshin et al., 2020). Перед экспериментом у губок выявляли функциональную целостность водоносной системы по наличию фильтрации воды через оскулюмы и очищали от сопутствующих беспозвоночных.

Эксперимент по диссоциации и реагрегации губки

Губок снимали с субстрата индивидуально, измельчали с помощью стерильных одноразовых микроскальпелей на приблизительно одинаковые части размером 2 × 2 × 2 мм в стерильной чашке Петри в морской воде, фильтрованной через фильтр 0.22 мкм (Merck Millipore, США), и диссоциировали с помощью пипетки со стерильным наконечником на 1000 мкл, как было описано ранее (Finoshin et al., 2020). Полученная суспензия была профильтрована через стерильное сито с диаметром поры 40 мкм (Life Sciences, США). Клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g. Клетки анализировали сразу после диссоциации. Были подсчитаны количество и процент живых клеток (обычно более 96–98%) в 10 мкл суспензии, смешанной с 10 мкл 0.4% трипанового синего с помощью стандартного гемоцитометра. Из части клеточной суспензии интактной губки выделяли РНК (см ниже). Другую часть клеточной суспензии в концентрации 1 × 10⁷ кл/мл высевали по 2 мл в лунки 6-луночного планшета и инкубировали 24 ч при температуре 5°C зимой и 10°C осенью для получения агрегатов, после чего их собирали в пробирки и выделяли РНК (Finoshin et al., 2020).

Реагрегация в условиях воздействия ингибиторов HDACs

Эксперименты по влиянию ингибиторов на процесс реагрегации проводили с губками, собранными осенью. Исследовали начальную стадию реагрегации и стадию образования первичных примморфов. Появление первичных клеточных агрегатов неправильной формы регистрировали через 1 ч, а многоклеточных агрегатов через 5–7 ч после диссоциации губок в соответствии с ранее опубликованными данными (Lavrov, Kosevich, 2014; Lavrov et al., 2020). Для регистрации первичных агрегатов фотосъемку проводили через 2 ч, а для первичных примморфов – через 20 и 24 ч после диссоциации клеток тела губки. Процесс реагрегации проводили в культуральных 4-луночных флаконах (SPL LifeSciences, Корея). В клеточную суспензию (объем 2 мл) добавляли бутират натрия, NaBu (до концентрации 0.5 и 2.5 мМ) или натриевую соль вальпроевой кислоты, VPA (до концентрации 2 и 8 мМ). В контрольную лунку добавляли соответствующее количество фильтрованной морской воды. Клетки инкубировали при температуре 5–7°C. Оценку морфологических параметров отдельных клеток и клеточных агрегатов проводили в указанные сроки с помощью световой микроскопии с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX51, снабженного 14-битной CCD-камерой Olympus XM10 под управлением лицензионного программного обеспечения CellSense, и шаттером UniBlitz model D122 под управлением программы Micro-manager. Суспензии клеток помещали в ячейки SPL Life Sciences 30104. При съемке применяли сухой фазовоконтрастный объектив LUCPlanFLN 40×. Для поддержания температурного режима во время съемки предметный столик микроскопа охлаждали хладогентами и дополнительно использовали систему OkoLab Uno, помещая емкость для увлажнения подаваемого к клеткам воздуха в лед. Размер и форму агрегатов анализировали в трех временных точках – через 2, 20 и 24 ч после диссоциации губок и инкубации клеток в присутствии NaBu 0.5 мМ, NaBu 2.5 мМ, VPA 2 мМ, VPA 8 мМ и в отсутствие ингибиторов (контроль). Агрегаты из 3–5 клеток не учитывались. К мелким относили агрегаты, хотя бы один линейный размер которых составлял от 20 до 40 мкм, к крупным – от 40 до 70 мкм. Самым большим был агрегат размером 70 мкм. Размер и форму агрегатов анализировали в трех временных точках – через 2, 20 и 24 ч после диссоциации губок и инкубации клеток в присутствии NaBu 0.5 мМ, NaBu 2.5 мМ, VPA 2 мМ, VPA 8 мМ и в отсутствие ингибиторов (контроль). Для каждой из 15 экспериментальных точек были сделаны по 10 фотографий произвольно выбранных полей зрения, на которых сформированы 4 группы (крупные шаровидные агрегаты, мелкие шаровидные агрегаты, крупные агрегаты непра-

вильной формы, мелкие агрегаты неправильной формы) и подсчитано количество агрегатов в группе. Для каждой из четырех выборок чисел, соответствующих количеству клеточных агрегатов разной морфологии определяли относительные значения, выраженные в процентах (абсолютные значения менялись в ходе эксперимента в сторону уменьшения благодаря постепенной сборке из мелких агрегатов меньшего количества более крупных). Статистическую обработку результатов экспериментов проводили при помощи лицензионного программного обеспечения Origin 6.1. Суммарное количество всех проанализированных клеточных агрегатов составило 1517 единиц. Дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с доверительным интервалом $p = 0.05$ показал, что для каждой экспериментальной точки средние значения выборок являются достоверно различными.

Выделение РНК, конструирование библиотек кДНК и секвенирование

РНК была выделена с использованием TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.), обработана DNase I (Ambion) и очищена с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) (Illumina). Для одно-концевых прочтений длиной 50 по мРНК была выделена с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) из 300 нг тотальной РНК. Фрагменты кДНК для библиотек получали с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina® (“New England Biolabs”, США), проверяли, используя Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit, и секвенировали на приборе Illumina Hiseq2500.

Транскриптомная сборка и анализ дифференциальной экспрессии

На основе транскриптомной сборки, полученной ранее на базе парно-концевых прочтений (Finoshin et al., 2020), произведено предсказание белковых продуктов с помощью TransDecoder v. 5.5 (Haas et al., 2013). Гомологи HDACs найдены с помощью программы blastp (Altschul, 1997). Одно-концевые прочтения для интактной губки, диссоциированных клеток и агрегатов были картированы на транскриптомную сборку с помощью bowtie 2 v. 2.4.1 (Langmead, Salzberg, 2012). Уровни экспрессии транскриптов были рассчитаны с помощью RSEM v. 1.3.3 (Li, Dewey, 2011), после фильтрации низкоэкспрессирующихся транскриптов они были нормализованы методом TMM (trimmed mean of M-values, усеченное среднее M-значений – логарифмированных уровней изменения экспрессии) и переведены в значения CPM (counts per million, число прочтений, отне-

сенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) с помощью пакета edgeR v. 3.32 (McCarthy et al., 2012). Были вычислены логарифмированные уровни изменения экспрессии в диссоциированных и реагрегировавших клетках по отношению к интактной ткани тела губки, из которой они были получены. Для каждого транскрипта был вычислен уровень значимости при модели отрицательно-биномиального распределения с факторами сезона и стадии реагрегации, скорректированный затем методом Бенджамина–Хобберга. В качестве порогового уровня FDR (false discovery rate, доли ложноположительных результатов) использован уровень 0.01. Ген считался дифференциально экспрессирующимся, если наблюдался хотя бы один случай достоверно изменяющейся экспрессии в процессе реагрегации. Полученные данные визуализированы с помощью пакета ComplexHeatmap v. 2.6.2 (Gu et al., 2016).

Филогенетический анализ деацетилаз гистонов классов I и II

Гомологи HDAC для выборки эукариотических организмов определяли при помощи кластеризации протеомов с программой OrthoFinder (Emms, Kelly, 2015). Для кластеризации использовали геномные данные из баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), а также Mnemiopsis Genome Project Portal (<https://research.nhgri.nih.gov/mnemiopsis/>) и Multicellgenome Lab (<https://multicellgenome.com>). Гомологи HDAC в геномных и транскриптомных данных губок *Oscarella pearsei* (https://figshare.com/articles/dataset/Oscarella_pearsei_assemblies/7107638/1) и *Sycon ciliatum* (<http://www.compgen.org/datasets.html>) искали программой BLASTp (Altschul, 1997). Последовательности из ортогрупп, соответствующих деацетилазам классов I и II, выравнивали программой MAFFT (Katoh, Standley, 2013) в режиме L-INS-i. При подготовке выравниваний для филогенетического анализа, их инспектировали вручную и обрабатывали методом gappayout программы trimAl (Capella-Gutierrez et al., 2009), с целью удаления сомнительных и разрозненных участков выравнивания. Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия, реализованного в программе IQ-TREE (Minh et al., 2020). Модели эволюции для реконструкции деревьев были выбраны на основе автоматического поиска с ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Статистическая поддержка узлов деревьев была рассчитана методом бутстрэпа с 1000 реплик. Визуализацию консенсусных деревьев проводили при помощи программы MEGA (Kumar et al., 2018).

Таблица 2. Zn²⁺-зависимые гистоновые деацетилазы (HDACs) губок *H. dujardini* и *A. queenslandica*. Указаны идентификационные номера в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

| Класс | Название | Локализация у человека | <i>H. dujardini</i> | <i>A. queenslandica</i> (идентичность в % с а.к. последовательностью <i>H. dujardini</i>) | <i>H. sapiens</i> (идентичность в % с а.к. последовательностью <i>H. dujardini</i>) |
|---|----------|------------------------|--------------------------------|---|---|
| I (гомологи RPD3 дрожжей) | HDAC1 | Ядро | BankIt2388591 Seq1 MW057352 | XP_003385311.1 (76%) | NP_004955.2 (78%) |
| | HDAC2 | Ядро | | | NP_001518.3 (75%) |
| | HDAC3 | Ядро | BankIt2388591 Seq5 MW057356 | XP_019850949.1 (81%) | NP_003874.2 (71%) |
| | HDAC8 | Ядро | BankIt2388591 Seq6 MW057357 | XP_003384638.1 (46%) | NP_060956.1 (48%) |
| IIa (гомологи HDA1 дрожжей) | HDAC4 | Ядро/ цитоплазма | BankIt2388591 Seq4 MW057355 | XP_011403467.2 (58%) | AAD29046.1 (53%) |
| | HDAC5 | Ядро/ цитоплазма | | | AAD29047.1 (53%) |
| | HDAC7 | Ядро/ цитоплазма | | | AAF63491.1 (51%) |
| | HDAC9 | Ядро/ цитоплазма | | | AAO27363.1 (51%) |
| IIb (несут два катализических сайта) | HDAC6 | Цитоплазма | BankIt2388591 Seq2 MW057353 | XP_003382755.1 (45%) | AAH13737.1 (49%) |
| | HDAC10 | Цитоплазма | | | AAS48345.1 (38%) |
| IV (имеют участки гомологии с классами I и II) | HDAC11 | Ядро/ цитоплазма | BankIt2388591 Seq3 MW057354 | XP_003389345.2 (67%) | NP_079103.2 (60%) |

РЕЗУЛЬТАТЫ

Аннотация Zn²⁺-зависимых HDACs губки *H. dujardini*

На основе транскриптомных сборок для *H. dujardini*, описанных нами ранее (NCBI, PRJNA594150), были идентифицированы представителей всех классов Zn²⁺-зависимых HDACs характерных для животных (табл. 2). Гистоновые деацетилазы класса I представлены у *H. dujardini* тремя генами, которые соответствуют ортологам HDAC1/2, HDAC3 и, предположительно, HDAC8 человека (рис. 1). Деацетилазы класса II представлены у *H. dujardini* двумя генами, группирующимиися с HDAC6/10 и HDAC4/5/7/9 животных (рис. 2). Состав Zn²⁺- зависимых деацетилаз у *H. dujardini* соответствует ожидаемому предковому состоянию для животных – сходный состав деацетилаз

также найден у губок *Amphimedon queenslandica* и *Sycon ciliatum* и представителей другой базальной ветви животных, гребневика *Mnemiopsis leidyi*. Дупликации, приведшие к обособлению HDAC6 и HDAC10, а также появлению дополнительных представителей группы HDAC4/5/7/9, возникают позже в эволюции животных. Так, обособленные HDAC6 и HDAC10 встречаются только у билатерально-симметричных животных. Дополнительный каталитический домен, характерный для деацетилаз HDAC6 и HDAC10 билатерий, отсутствует у *H. dujardini* и других ранних представителей животных (рис. 3а), что указывает на более позднее возникновение второго домена у HDAC6/10 путем дупликации. Также, как и у млекопитающих, у губок на C конце HDAC6 присутствует убиквитин-связывающий домен (рис. 3б). Таким образом, как и ожидалось, мы обнаружи-

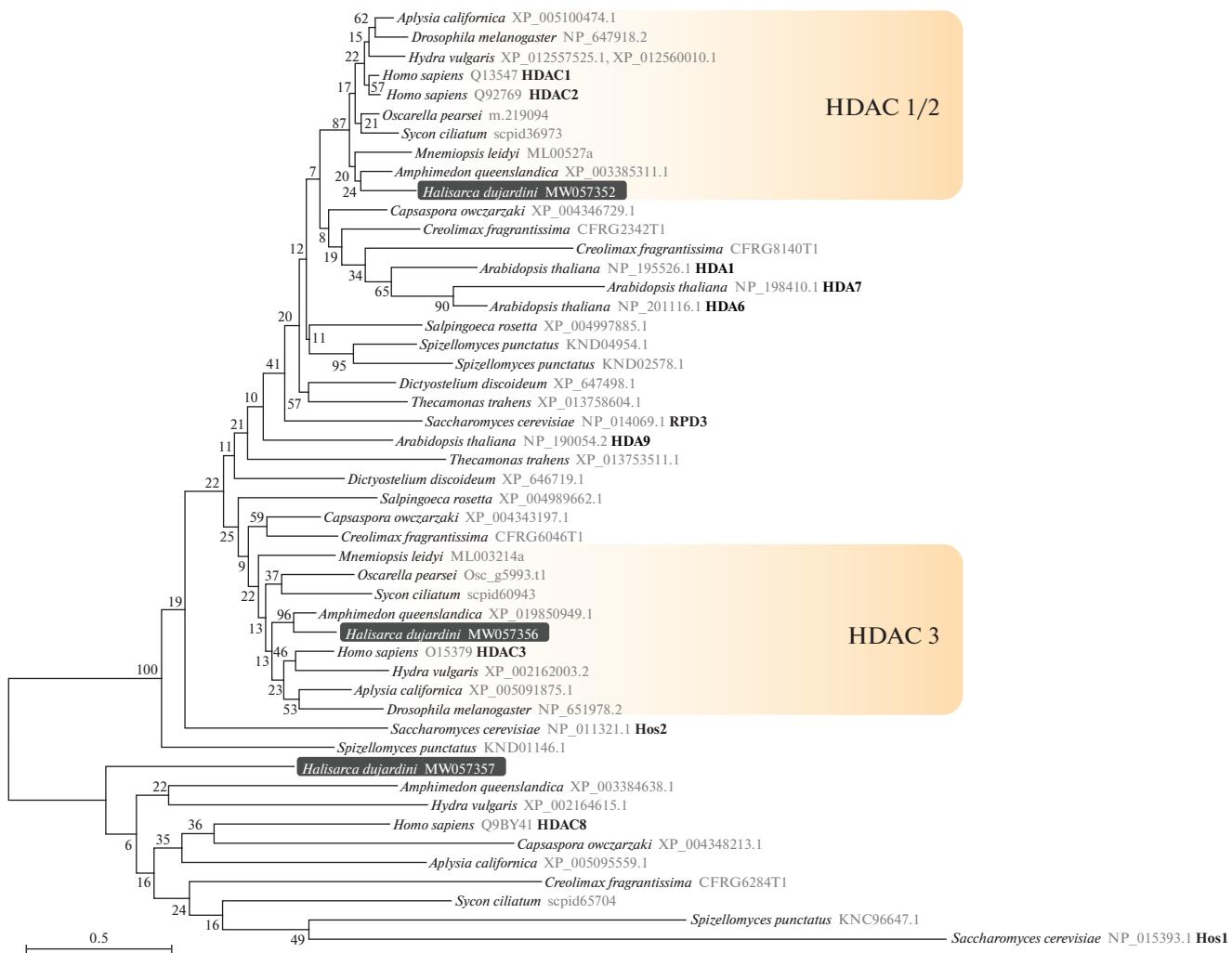


Рис. 1. Филогенетическое дерево деацетилаз гистонов класса I. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с программой IQ-TREE; для реконструкции была использована модель эволюции LG + I + G4, выбранная при помощи ModelFinder как наиболее подходящая; цифры на ветвях дерева соответствуют значениям поддержки в процентах, рассчитанным методом бутстрэпа с 1000 реплик. На дереве выделены последовательности HDAC из *H. dujardini*, а также отмечены и названы группы HDAC животных, соответствующие ортологам из *Homo sapiens*. Последовательность *H. dujardini* MW057357 группируется вместе с дивергентными представителями деацетилаз класса I, в числе которых HDAC8 из *H. sapiens*, и, вероятно, является ортологом HDAC8, однако данная группа не отмечена на дереве, так как последовательности из животных не образуют монофилетическую группу, кластеризуясь с деацетилазами из грибов, включая Hos1 дрожжей.

ли у *H. dujardini* HDAC1/2 (HDAC1), HDAC3, HDAC8 (класс I); HDAC4/5/7/9 (HDAC4), HDAC6/10 (HDAC6) (класс II); HDAC11 (класс IV). Из всех HDACs *H. dujardini*, представители первого класса, HDAC1 и HDAC3, имеют наибольшее сходство с белками человека (табл. 2), а HDAC6 и 8 – наименьшее сходство.

Дифференциальная экспрессия генов HDACs в процессе реагрегации

Для того, чтобы охарактеризовать экспрессию HDACs в ходе реагрегации, мы сравнили методом RNA-seq уровень их экспрессии в интактных губ-

ках, клеточной суспензии и агрегатах. Эксперимент по реагрегации был проведен в лабораторных условиях, как описано в Материалах и методах. В ходе агрегации наблюдался достаточно высокий уровень экспрессии всех деацетилаз, кроме HDAC8 (табл. 3, рис. 4), самый высокий уровень экспрессии был у HDAC1. Экспрессия HDAC4 в ходе агрегации не изменялась, все остальные гистоновые деацетилазы экспрессировались дифференциально. Так, образование агрегатов сопровождалось увеличением экспрессии HDAC1 и 6 и уменьшением экспрессии HDAC3, 8 и 11. Несмотря на некоторые различия в среднем уровне экспрессии в интактных губках, собранных осе-

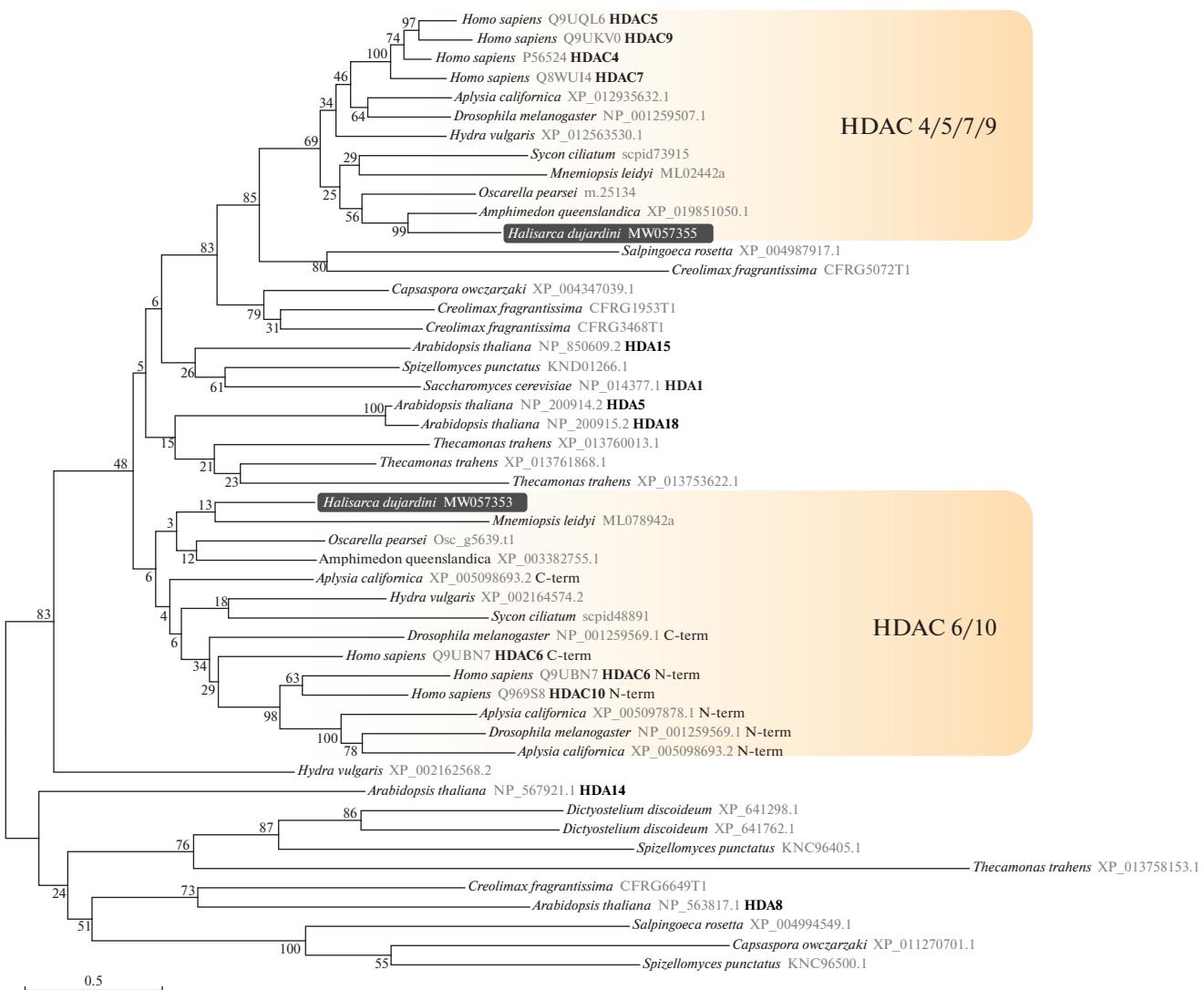


Рис. 2. Филогенетическое дерево деацетилаз гистонов класса II. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с программой IQ-TREE; для реконструкции была использована модель эволюции LG + R5, выбранная при помощи ModelFinder как наиболее подходящая; цифры на ветвях дерева соответствуют значениям поддержки в процентах, рассчитанным методом бутстрэпа с 1000 реплик. На дереве выделены последовательности HDAC из *H. dujardini*, а также отмечены и названы группы HDAC животных, соответствующие ортологам из *Homo sapiens*. Деацетилазы животных HDAC 6/10 с двумя катализитическими доменами были разделены на N-терминальный (N-term) и C-терминальный (C-term) домены; высоко дивергентный C-терминальный домен HDAC10 из *H. sapiens* и *Aplysia californica* был исключен из анализа.

ньо и зимой, для этих деацетилаз наблюдалась сходные изменения в процессе реагрегации. Изменение экспрессии деацетилаз в ходе реагрегации свидетельствует о возможном их участии в регуляции этого процесса.

Влияние ингибиторов HDACs NaBu и VPA на процесс реагрегации

Нами были проведены опыты по реагрегации клеток губки после механической диссоциации ее тела на отдельные клетки в присутствии ингибиторов HDACs – NaBu и VPA. Ингибиторы NaBu и

VPA селективно действуют на HDACs класса I, поэтому из двух деацетилаз этого класса, показывающих высокую экспрессию в агрегатах (HDAC1 и 6, рис. 4), они могут ингибировать только HDAC1 (Matsuyama, 2002). Выбор концентраций ингибиторов осуществляли на основе данных литературы (табл. 1) и предварительных экспериментов. Известно, что 0.5 мМ NaB и 2 мМ VPA не оказывают выраженного токсического эффекта на клетки. Эти концентрации ингибиторов были использованы как начальные. Губки механически диссоциировали (рис. 5а) и инкубировали в присутствии ингибиторов или без таковых (рис. 6).

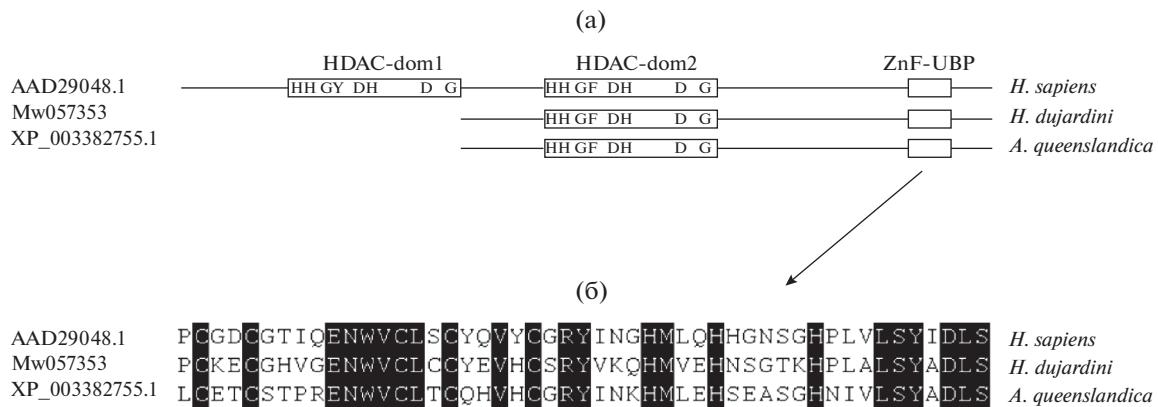


Рис. 3. (а) Структура белка HDAC6 у губок (*H. dujardini* и *A. queenslandica*) и человека. Показаны консервативные аминокислоты для HDAC6-dom1 и HDAC6-dom2 доменов. (б) Убиквитин-связывающий домен (ZnF-UBP). Черным цветом показаны консервативные аминокислоты.

Через 2 ч после получения суспензии во всех образцах наблюдали слипание клеток и образование преимущественно мелких агрегатов (20–40 мкм), неправильной формы (рис. 5в) и некоторого количества мелких агрегатов правильной формы (рис. 5б), что соответствует начальной стадии реагрегации. В дальнейшем появлялись крупные агрегаты (40–70 мкм) неправильной (рис. 5д) и правильной шаровидной формы (рис. 5г). Через 20 ч после диссоциации стали очевидны различия между контрольными и опытными образцами в количестве крупных агрегатов шаровидной формы – в опытных образцах в присутствии 2.5 мМ NaBu и 8 мМ VPA их относительное количество было значительно снижено по сравнению с контрольными образцами (рис. 6). Этот эффект был более выражен после 24 ч инкубации – пробы с ингибиторами отличались от контрольных низ-

ким относительным количеством агрегатов правильной шарообразной формы (рис. 6). При этом ингибитор VPA в концентрации 8 мМ оказывал более сильное ингибирующее действие на продукцию крупных правильных агрегатов, чем NaBu в концентрации 2.5 мМ (рис. 6). Таким образом, эффект ингибиторов заключался в уменьшении эффективности образования крупных агрегатов правильной формы. Оба ингибитора HDACs замедляли и, очевидно, нарушили процесс реагрегации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у губок *H. dujardini*, *A. queenslandica* и *Sycon ciliatum* система деацетилирования белков сложно устроена: у них имеются представители всех классов

Таблица 3. Уровень экспрессии в интактных губках (тк), клеточной суспензии (кл) и агрегатах (аг), рассчитанный в СРМ (число прочтений, отнесенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) после нормализации методом ТММ (усеченное среднее М-значений); логарифмированные уровни изменения экспрессии (log fold change) в диссоциированных клетках и агрегатах по отношению к интактной ткани (кл-тк и аг-тк); уровень значимости *P*; скоректированные уровни значимости FDR (false discovery rate, доля ложноположительных результатов)

| Наз- вание | Уровень экспрессии, зима | | | | | | | | | Уровень экспрессии, осень | | | | | | | | | log fold change, зима | log fold change, осень | <i>P</i> | FDR |
|---------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|---------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-----------------------------|------------------------------|----------|-----|
| | тк1 | тк2 | тк3 | кл1 | кл2 | кл3 | аг1 | аг2 | аг3 | тк1 | тк2 | кл1 | кл2 | аг1 | аг2 | кл-тк | аг-тк | кл-тк | аг-тк | | | |
| HDAC1 | 40.42 | 38.43 | 39.91 | 49.09 | 49.97 | 49.73 | 144.72 | 87.82 | 106.26 | 72.92 | 72.20 | 47.20 | 45.03 | 104.63 | 103.57 | 0.32 | 1.51 | -0.65 | 0.52 | 0.00010 | 0.00113 | |
| HDAC3 | 17.33 | 15.44 | 15.79 | 15.68 | 17.61 | 16.32 | 4.99 | 7.12 | 4.57 | 31.44 | 28.94 | 27.96 | 28.24 | 15.72 | 16.22 | 0.03 | -1.52 | -0.10 | -0.91 | 0.00002 | 0.00033 | |
| HDAC4 | 11.13 | 12.51 | 12.24 | 22.43 | 23.53 | 24.07 | 8.02 | 9.91 | 7.90 | 25.44 | 26.84 | 27.20 | 26.36 | 39.87 | 36.32 | 0.96 | -0.47 | 0.03 | 0.54 | 0.05862 | 0.13030 | |
| HDAC6 | 33.18 | 26.61 | 31.62 | 24.50 | 25.63 | 25.00 | 46.93 | 56.49 | 65.50 | 35.90 | 41.92 | 24.59 | 24.33 | 128.15 | 125.83 | -0.28 | 0.88 | -0.67 | 1.70 | 0.00001 | 0.00015 | |
| HDAC8 | 4.92 | 4.71 | 4.99 | 4.09 | 3.41 | 3.72 | 2.40 | 1.21 | 1.98 | 5.89 | 4.94 | 7.26 | 7.68 | 1.21 | 1.23 | -0.37 | -1.34 | 0.46 | -2.07 | 0.00029 | 0.00257 | |
| HDAC11 | 24.96 | 18.71 | 21.86 | 16.81 | 18.13 | 21.68 | 8.10 | 9.37 | 10.07 | 30.61 | 31.70 | 17.41 | 17.84 | 19.23 | 18.38 | -0.21 | -1.24 | -0.82 | -0.73 | 0.00119 | 0.00731 | |

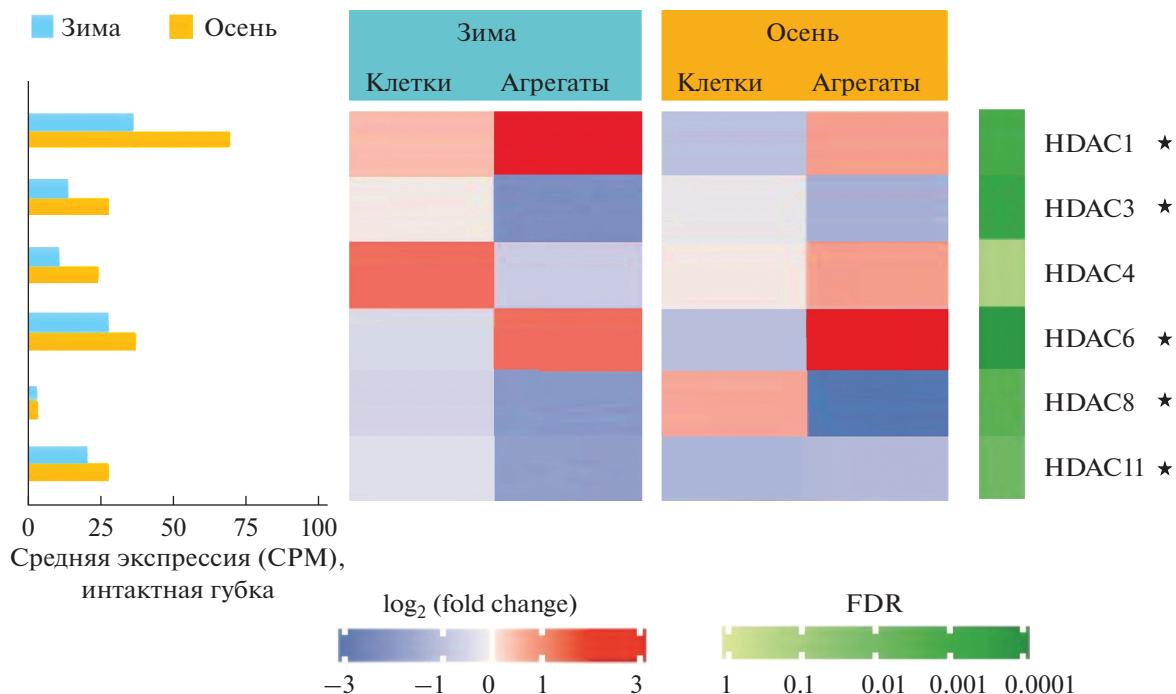


Рис. 4. Анализ дифференциальной экспрессии гистоновых деацетилаз (HDACs) во время диссоциации и реагрегации губки *H. dujardini*. Слева показан средний уровень экспрессии в интактных губках для зимних и осенних образцов, рассчитанный в СРМ (число прочтений, отнесенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) после нормализации методом TMM (усеченое среднее М-значений). На тепловой карте справа показаны логарифмированные уровни изменения экспрессии (\log_2 fold change) в диссоциированных клетках и агрегатах по отношению к интактной ткани и скорректированные уровни значимости FDR (false discovery rate, доля ложноположительных результатов). * FDR < 0.01.

Zn^{2+} -зависимых деацетилаз гистонов (HDACs), характерных для животных (табл. 2, рис. 1, 2). Наибольший уровень экспрессии в теле губки обнаружен у принадлежащей к классу I деацетилазе HDAC1. Деацетилазы класса I широко распространены у разных животных. Они экспрессируются в тканях всех типов и имеют большее значение для выживания клеток и пролиферации, чем HDACs других классов (Marks, 2010). HDACs класса I участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток в эмбриональном развитии (Choi et al., 2001; Lagger, 2002; Sjoblom et al., 2006; Wilson et al., 2006; Montgomery et al., 2007; Bhaskara et al., 2008). Именно деацетилазы класса I губок, HDAC1 и 3, имеют наибольшее сходство в аминокислотной последовательности с гомологичными белками человека, что говорит об эволюционной консервативности их структуры и, вероятно, функции. Модификация “гистонового кода” за счет активности деацетилаз является ключевым звеном в эпигенетической регуляции функционирования генома (Wang et al., 2008).

Одна из удобных модельных систем, позволяющая исследовать поведение и процессы де/дифференцировки и трансдифференцировки клеток у Porifera – формирование агрегатов из диссоциированных клеток губок. Мы использовали эту

модель для оценки дифференциальной экспрессии деацетилаз гистонов в клетках губок в процессах диссоциации и реагрегации. Было обнаружено, что экспрессия деацетилаз разных классов изменяется в ходе реагрегации клеток *H. dujardini* дифференциально – экспрессия HDAC1 и 6 увеличивается, а экспрессия HDAC3, 8 и 11 уменьшается. Эти результаты позволили сделать предположение о том, что деацетилазы гистонов могут быть вовлечены в регуляцию процесса реагрегации. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по реагрегации с использованием селективных ингибиторов HDACs I класса.

Мы обнаружили, что селективные ингибиторы HDACs I класса нарушают процесс реагрегации клеток *H. dujardini* – под их воздействием уменьшается доля крупных агрегатов (40–70 мкм) и агрегатов шаровидной формы. Причем этот эффект зависит от дозы ингибитора – с увеличением его концентрации наблюдаемый эффект усиливается (рис. 5 и 6). Опыты с селективными ингибиторами показывают важную роль HDACs I класса для нормального протекания процесса реагрегации. Поскольку начальные этапы реагрегации клеток контрольной и опытной групп не отличаются (рис. 5б, 5в), очевидно, что уменьшение доли

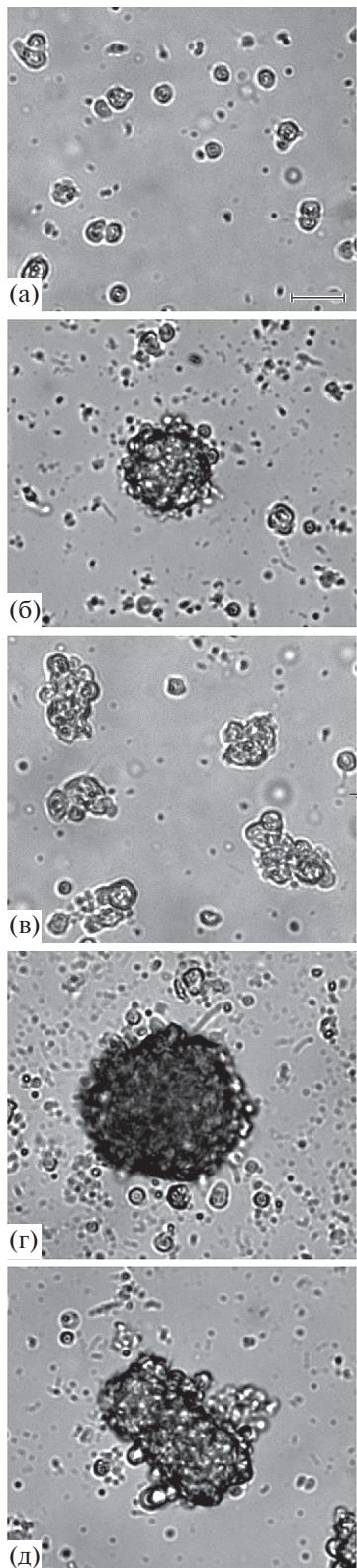


Рис. 5. (а) Одиночные клетки, (б–д) – агрегаты: мелкие шаровидные (б), мелкие неправильной формы (в), крупные шаровидные (г) и крупные неправильной формы (д). Масштабный отрезок 20 мкм.

крупных агрегатов происходит или вследствие нарушения слияния мелких клеточных агрегатов, или за счет нарушения включения свободных клеток из суспензии. Также возможно, что мелкие клеточные агрегаты в опытной и контрольной группе различны по составу морфологических типов клеток. Регуляция экспрессии генов в процессе клеточной дедифференцировки осуществляется с помощью различных механизмов, среди которых большое значение имеет эпигенетическая регуляция (Wang et al., 2008; Smith, Meissner, 2013). Дедифференциация происходит вскоре после диссоциации тела губки и во время нее, когда большинство клеток теряют свои морфологические признаки, приобретая амебоидный фенотип (Lavrov, Kosevich, 2016), а первичные мелкие агрегаты представляют собой совокупность клеток, имеющих амебовидную или шаровидную формы (Lavrov, Kosevich, 2016; Ereskovsky et al., 2021). Можно предположить, что снижение активности деацетилаз может влиять на дедифференцировку клеток в суспензии или снижать подвижность и адгезивные свойства клеток амебоидного типа, необходимых для установления межклеточных контактов (Inoue et al., 2006; Sacks et al., 2018).

Дифференциальная экспрессия деацетилаз и нарушения, наблюдаемые при воздействии ингибиторов, могут также указывать на важную роль циклов ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков в регуляции реагрегации клеток губок. Такое предположение подтверждается имеющейся информацией о роли деацетилаз в модификации транскрипционных факторов (Marks, 2010).

У интактных губок *H. dujardini* ген HDAC6 показал довольно высокий уровень экспрессии, и его экспрессия повышалась в клеточных агрегатах (рис. 3). Возможно, что участие именно этой деацетилазы – HDAC6 (класс IIb) – в регуляции реагрегации является важным. Мы показали, что HDAC6 губок *H. dujardini* и *A. queenslandica* имеет деацетилазный домен dom2 и на С-конце сайт связывания убиквитина. Данные литературы говорят о том, что деацетилазный домен dom2 участвует в деацетилировании тубулина (Matsuyama, 2002; Haggarty et al., 2003) и HSP90 (Marks, 2010). Снижение экспрессии HDAC6 приводит к накоплению этих белков в ацетилированном виде. Ацетилированный белок HSP90 теряет функции шаперона, а его партнеры убиквитинируются и деградируют (Kawaguchi et al., 2003; Boyault et al., 2006). Не вызывает сомнения важная роль HSP90 в морфогенетических процессах у беспозвоночных, о чем свидетельствуют данные литературы, показывающие, что его экспрессия меняется в процессе развития (Giudice et al., 1999; Bishop et al., 2001; Bishop, Brandhorst, 2001; Gunter, Degnan, 2007).

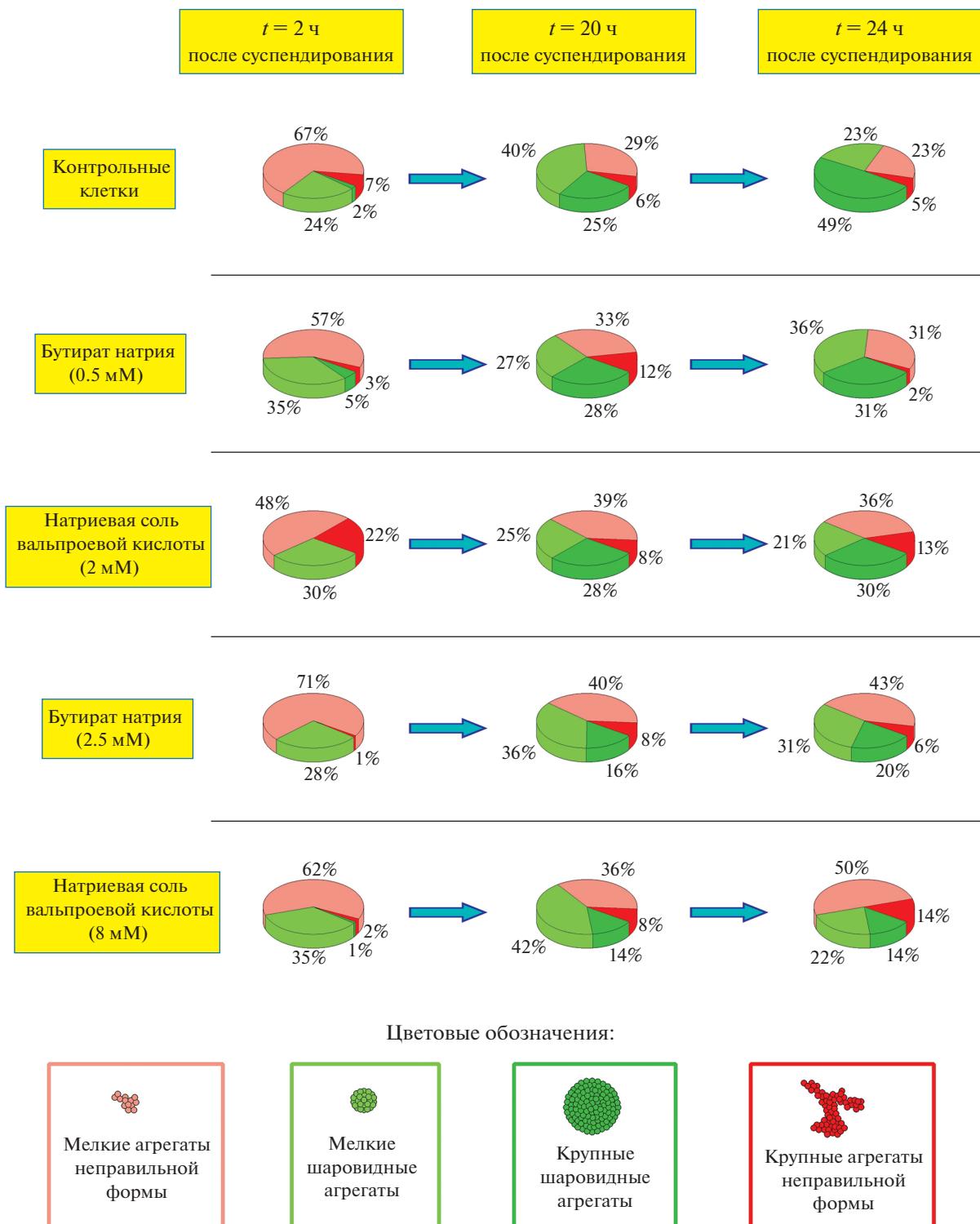


Рис. 6. Образование клеточных агрегатов губки в присутствии ингибиторов HDACs.

Проведенное исследование показало, что система деацетилирования лизина в молекулах белка у губки *H. dujardini* имеет общие функциональные характеристики с таковой у позвоночных животных (в т.ч. человека). Это эволюционно древний ме-

ханизм регуляции активности генома. Вопрос о возможном участии деацетилаз, и особенно HDAC6, в регуляции клеточных процессов, необходимых для реагрегации клеток губок, заслуживает дополнительного изучения. Дальнейшее изучение

деацетилаз и их белков-мишеней у губок и других беспозвоночных позволит выяснить закономерности эволюции молекулярных механизмов, регулирующих процессы развития многоклеточных животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала туристическому центру “Полярный Круг”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90019. Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 № ГЗ 0088-2021-0008. Секвенирование осуществлено в рамках гранта РНФ 20-44-07002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

О.И. Кравчук – идея исследования, планирование экспериментов, координация проекта, подготовка рисунков, написание статьи. А.Д. Бураков – сбор материала, эксперимент с ингибиторами, микроскопия, статистический анализ, подготовка рисунков. Н.Г. Горностаев – сбор материала, микроскопия, статистический анализ. К.В. Михайлов – филогенетический анализ, подготовка рисунков. К.И. Адаменко – сборка транскриптомов, аннотация HDACs, анализ дифференциальной экспрессии, подготовка рисунков. А.Д. Финошин – эксперимент по реагрегации. А.А. Георгиев – сбор материала. В.С. Михайлов – написание статьи. Ю.Э. Ерюкова – эксперимент по реагрегации. Г.А. Рубиновский – эксперимент по реагрегации. Д.В. Заец – эксперимент по реагрегации. Г.Р. Газизова – подготовка библиотек для секвенирования. О.А. Гусев – координация проекта. Е.И. Шагимарданова – секвенирование. Ю.В. Люпина – сбор материала, координация проекта, написание статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зенкевич Л.А. Биология морей СССР / Москва: АН СССР, 1963. 738 с.
- Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (обзор) // Труды Карельского научного центра РАН. 2011. № 3. С. 121–130.
- Adamska M. Differentiation and transdifferentiation of sponge cells // Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine Results and Problems in Cell Differentiation / Ed. Kloc J.Z. Kubiak. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 229–253.
- Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
- Bhaskara S., Chyla B.J., Amann J.M. et al. Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control // Molecular Cell. 2008. V. 30. № 1. P. 61–72.
- Bishop C.D., Bates W.R., Brandhorst B.P. Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP; signaling and HSP90 // J. Exp. Zool. 2001. V. 289. № 6. P. 374–384.
- Bishop C.D., Brandhorst B.P. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus* // The Biological Bulletin. 2001. V. 201. № 3. P. 394–404.
- Boyault C., Gilquin B., Zhang Y. et al. HDAC6–p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover // EMBO J. 2006. V. 25. № 14. P. 3357–3366.
- Capella-Gutierrez S., Silla-Martinez J.M., Gabaldon T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 15. P. 1972–1973.
- Chen J., Lacroix N., Li Q. Histone deacetylase inhibitor valproic acid as a small molecule inducer to direct the differentiation of pluripotent stem cells // Gene Regulation Methods in Molecular Biology / Ed. Bina M. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. P. 359–363.
- Choi J.-H., Kwon H.J., Yoon B.I. et al. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues // Japanese Journal of Cancer Research. 2001. V. 92. № 12. P. 1300–1304.
- Costa S., Nicosia A., Cuttitta A. et al. An intronic cis-regulatory element is crucial for the alpha tubulin PI-tuba1a gene activation in the ciliary band and animal pole neurogenic domains during sea urchin development // PLoS One. 2017. 12:e0170969.
- D’Anna J.A., Tobey R.A., Gurley L.R. Concentration-dependent effects of sodium butyrate in Chinese hamster cells: cell-cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation, and induction of an H1-like protein // Biochemistry. 1980. V. 19. № 12. P. 2656–2671.
- Emms D.M., Kelly S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy // Genome Biol. 2015. V. 16. № 1. P. 157.
- Ereskovsky A. Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrassata* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea // The Biological Bulletin. 2000. V. 198. № 1. P. 77–87.

- Ereskovsky A., Borisenco I.E., Bolshakov F.V. et al. Whole-body regeneration in sponges: Diversity, fine mechanisms, and future prospects // *Genes.* 2021. V. 12. № 4. P. 506.
- Ereskovsky A.V., Chernogor L.I., Belikov S.I. Ultrastructural description of development and cell composition of primmorphs in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // *Zoomorphology.* 2016. V. 135. № 1. P. 1–17.
- Ereskovsky A.V., Renard E., Borchellini C. Cellular and molecular processes leading to embryo formation in sponges: evidences for high conservation of processes throughout animal evolution // *Dev. Genes Evol.* 2013. V. 223. № 1–2. P. 5–22.
- Fagot D., Buquet-Fagot C., Lallemand F. et al. Antiproliferative effects of sodium butyrate in adriamycin-sensitive and -resistant human cancer cell lines: // *Anti-Cancer Drugs.* 1994. V. 5. № 5. P. 548–556.
- Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mikhailov K.V. et al. Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 2. P. e0228722.
- Giudice G., Sconzo G., Roccheri M.C. Studies on heat shock proteins in sea urchin development // *Dev. Growth Differ.* 1999. V. 41. № 4. P. 375–380.
- Gu Z., Eils R., Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data // *Bioinformatics.* 2016. V. 32. № 18. P. 2847–2849.
- Gunter H.M., Degnan B.M. Developmental expression of Hsp90, Hsp70 and HSF during morphogenesis in the vetigastropod *Haliotis asinina* // *Dev. Genes Evol.* 2007. V. 217. № 8. P. 603–612.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 8. P. 1494–1512.
- Haggarty S.J., Koeller K.M., Wong J.C. et al. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003. V. 100. № 8. P. 4389–4394.
- Heers H., Stanislaw J., Harrelson J. et al. Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer // *European J. Pharmacology.* 2018. V. 835. P. 61–74.
- Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 795–797.
- Inoue K., Kobayashi M., Yano K. et al. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. V. 26. P. 2652–2659.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 6. P. 587–589.
- Kang S.-J., Park Y.I., So B. et al. Sodium butyrate efficiently converts fully reprogrammed induced pluripotent stem cells from mouse partially reprogrammed cells // *Cellular Reprogramming.* 2014. V. 16. № 5. P. 345–354.
- Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability // *Molecular Biology and Evolution.* 2013. V. 30. № 4. P. 772–780.
- Kawaguchi Y., Kovacs J.J., McLaurin A. et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress // *Cell.* 2003. V. 115. № 6. P. 727–738.
- Kondo Y., Iwao T., Yoshihashi S. et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e104010.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution.* 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
- Lavrov A.I., Kosevich I.A. Sponge cell reaggregation: Mechanisms and dynamics of the process // *Russ. J. Dev. Biol.* 2014. V. 45. P. 205–223.
<https://doi.org/10.1134/S1062360414040067>
- Lagger G. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression // *The EMBO J.* 2002. V. 21. № 11. P. 2672–2681.
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
- Lavrov A.I., Saidov D.M., Bolshakov F.V. et al. Intraspecific variability of cell reaggregation during reproduction cycle in sponges // *Zoology.* 2020. V. 140. P. 125795.
- Lavrov A.I., Kosevich I.A. Sponge cell reaggregation: Mechanisms and dynamics of the process // *Russ. J. Dev. Biol.* 2014. V. 45. № 4. P. 205–223.
- Lavrov A.I., Kosevich I.A. Sponge cell reaggregation: Cellular structure and morphogenetic potencies of multicellular aggregates // *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 2016. V. 325. P. 158–177.
- Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 12. № 1. P. 323.
- Liang G., Taranova O., Xia K. et al. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation // *J. Biological Chemistry.* 2010. V. 285. № 33. P. 25516–25521.
- Louis M., Rosato R.R., Brault L. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress // *Int. J. Oncol.* 2004. V. 25. № 6. P. 1701–1711.
- Mahapatra P.S., Singh R., Kumar K. et al. Valproic acid assisted reprogramming of fibroblasts for generation of pluripotent stem cells in buffalo (*Bubalus bubalis*) // *Int. J. Dev. Biol.* 2017. V. 61. № 1–2. P. 81–88.
- Mali P., Chou B.K., Yen J. et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes // *STEM CELLS.* 2010. V. 28. № 4. P. 713–720.
- Marks P.A. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs // *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2010. V. 19. № 9. P. 1049–1066.
- Matsuyama A. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 24. P. 6820–6831.
- McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 10. P. 4288–4297.

- McClure J.J., Li X., Chou C.J.* Advances and challenges of HDAC inhibitors in cancer therapeutics // *Advances in Cancer Research*. Elsevier, 2018. P. 183–211.
- Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I. et al.* Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage // *Stem Cells and Development*. 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
- Michaelis M., Doerr H.W., Cinatl J.* Valproic acid as anti-cancer drug // *Curr. Pharm. Des.* 2007. V. 13. № 33. P. 3378–3393.
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al.* IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era // *Molecular Biology and Evolution*. 2020. V. 37. № 5. P. 1530–1534.
- Montgomery R.L., Davis C.A., Potthoff M.J. et al.* Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility // *Genes Dev.* 2007. V. 21. № 14. P. 1790–1802.
- Pazin M.J., Kadonaga J.T.* What's up and down with histone deacetylation and transcription? // *Cell*. 1997. V. 89. № 3. P. 325–328.
- Phiel C.J., Zhang F., Huang E.Y. et al.* Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen // *J. Biological Chemistry*. 2001. V. 276. № 39. P. 36734–36741.
- Sacks D., Baxter B., Campbell B.C.V. et al.* Multisociety consensus quality improvement revised consensus statement for endovascular therapy of acute ischemic stroke // *Int. J. Stroke*. 2018. V. 13. P. 612–632.
- Silva L.G., Ferguson B.S., Avila A.S. et al.* Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells1 // *J. Animal Science*. 2018. V. 96. P. 5244–5252.
- Sipkema D., van Wielink R., van Lammeren A.A.M. et al.* Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure // *J. Biotechnology*. 2003. V. 100. № 2. P. 127–139.
- Sjöblom T., Jones S., Wood L.D. et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers // *Science*. 2006. V. 314. № 5797. P. 268–274.
- Smith Z.D., Meissner A.* DNA methylation: roles in mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. P. 204–220.
- Sogabe S., Hatleberg W.L., Kocot K.M. et al.* Pluripotency and the origin of animal multicellularity // *Nature*. 2019. V. 570. № 7762. P. 519–522.
- Stillman J.H.* Causes and consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus petrolisthes // *Integr. Comp. Biol.* 2002. V. 42. P. 790–796.
- Tang Y., Chen Y., Jiang H. et al.* The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer // *Autophagy*. 2011. V. 7. № 2. P. 235–237.
- Terranova-Barberio M., Pecori B., Roca M.S. et al.* Synergistic antitumor interaction between valproic acid, capecitabine and radiotherapy in colorectal cancer: critical role of p53 // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2017. V. 36. № 1. P. 177.
- Tran L.N.K., Kichenadasse G., Sykes P.J.* Combination therapies using metformin and/or valproic acid in prostate cancer: possible mechanistic interactions // *CCDT*. 2019. V. 19. № 5. P. 368–381.
- Wang Y.-F., Chen N.S., Chung Y.P. et al.* Sodium butyrate induces apoptosis and cell cycle arrest in primary effusion lymphoma cells independently of oxidative stress and p21CIP1/WAF1 induction // *Mol. Cell. Biochem.* 2006. V. 285. № 1–2. P. 51–59.
- Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A. et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome // *Nat Genet*. 2008. V. 40. P. 897–903.
- Wilson A.J., Byun D.S., Popova N. et al.* Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer // *J. Biological Chemistry*. 2006. V. 281. № 19. P. 13548–13558.
- Wilson H.V.* On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges // *J. Exp. Zool.* 1907. V. 5. № 2. P. 245–258.
- Zhang Z., Wu W.-S.* Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster // *Stem Cells and Development*. 2013. V. 22. № 16. P. 2268–2277.

Histone Deacetylases in the Process of *Halisarca dujardinii* Cell Reaggregation

O. I. Kravchuk^{1,*}, A. V. Burakov², N. G. Gornostaev¹, K. V. Mikhailov^{2,3}, K. I. Adameyko¹, A. D. Finoshin¹, A. A. Georgiev⁴, V. S. Mikhailov¹, Y. E. Yeryukova⁴, G. A. Rubinovsky⁵, D. V. Zayts⁶, G. R. Gazizova⁷, O. A. Gusev^{7,8}, E. I. Shagimardanova⁷, and Y. V. Lyupina¹

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

²Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Leninskye gory 1, build. 40, Moscow, 119991 Russia

³Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, per. Bolshoy Karetny 19, build. 1, Moscow, 127051 Russia

⁴Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119991 Russia

⁵Pirogov Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

⁶First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8, build. 2, Moscow, 119991 Russia

⁷Kazan Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

⁸Department of Regulatory Transcriptomics for Medical Diagnostics, Juntendo University, Tokyo, 113-8421 Japan

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Epigenetic modification of proteins by the lysine acetylation/deacetylation is widely used in eukaryotes. Histone deacetylases decrease the acetylation level of chromatin that results in inhibition of gene transcription. Involvement of the histone deacetylases in regulation of cell proliferation and differentiation, embryogenesis, tumor induction and progression is well confirmed in the vertebrate species. However, the regulation mechanisms associated with the histone deacetylases remain largely unknown in basal Metazoan species. The dedifferentiation and transdifferentiation of sponge cells that accompanied their reaggregation suggests participation of the histone deacetylases in regulation of the reaggregation process. In this report, we investigated expression of the histone deacetylases in the sea sponge *Halisarca dujardini* (Demospongia). All known members of the Zn²⁺-dependent HDACs were identified under analysis of the *H. dujardini* transcriptomic and *Amphimedon queenslandica* (Demospongia) genomic data. The differentional expression of HDACs was analyzed in the cell suspension after dissociation of the sponge *H. dujardini* body and in the cellular aggregates after reaggregation for 24 hours. The dose-dependent effect of two specific inhibitors of the class I HDACs (sodium butyrate and valproic acid) on the reaggregation process was determined. The addition of each specific inhibitor of the class I HDACs into the reaggregation media was resulted in a change of morphology of cellular aggregates. These data suggest that the involvement of histone deacetylases in regulation of cell trans-differentiation has been emerged as an evolutionarily ancient mechanism prior the tissue specification patterning.

Keywords: *Halisarca dujardinii*, Porifera, Demospongia, cell transdifferentiation, cell dissociation, cell reaggregation, histone deacetylases, transcriptome

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО
И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

УДК 611.81.013

ГЛУТАМИНСИНТЕАЗА В КЛЕТКАХ ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ
СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2021 г. Е. А. Колос^а, *, Д. Э. Коржевский^а

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт экспериментальной медицины”,
ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.03.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 30.04.2021 г.

Формирование глутаматергической системы спинного мозга широко изучается, однако исследования, посвященные изучению динамики формирования глутаминсингтетаза-содержащих структур, обеспечивающих защиту нервных клеток эмбрионального спинного мозга от токсического воздействия глутамата, практически отсутствуют. В настоящей работе изучены локализация, распределение и морфологические особенности клеток спинного мозга (СМ) крыс, экспрессирующих глутаминсингтетазу (ГС), в эмбриональном и в раннем постнатальном периоде с применением иммуноhistохимических методов. Установлено, что первые клетки, содержащие ГС, идентифицируются вентральной части эпендимного слоя формирующегося СМ в период начала глиогенеза – на 15 сут эмбрионального развития. Через сутки клетки, экспрессирующие фермент, присутствуют также в мантийном слое СМ. В настоящем исследовании впервые показано, что часть клеток пограничной шапочки (boundary cap cells), располагающихся в переходной зоне между СМ и периферической нервной системой, синтезирует глутаминсингтетазу. Настоящее исследование позволило определить динамику формирования ГС-содержащих глиальных клеток эмбрионального спинного мозга и предположить функциональное значение таких клеток в эмбриогенезе.

Ключевые слова: глутаминсингтетаза, спинной мозг, эмбриогенез, клетки пограничной шапочки, астроциты

DOI: 10.31857/S0475145021050049

ВВЕДЕНИЕ

В спинном мозге основным возбуждающим нейромедиатором является глутамат (Todd et al., 2003; Todd, 2010). Известно, что повышенная концентрация внеклеточного глутамата может привести к эксайтотоксичности и гибели нейронов (Choi et al., 1987; Danbolt, 2001). Токсическое воздействие глутамата отмечено как важный патогенетический фактор при большом количестве нейродегенеративных заболеваний (Miguel-Hidalgo et al., 2010; Bame et al., 2012; Kulijewicz-Nawrot et al., 2013; Lewerenz, Maher, 2015). Поддержание концентрации внеклеточного глутамата на физиологическом уровне регулируется клетками нейроглии. Показано, что около 80% высвобожденного из пресинаптического нервного окончания глутамата поглощается глиальными клетками и превращается в нетоксичную для нейронов аминокислоту глутамин. Для осуществления этого процесса необходим фермент глутаминсингтетаза (ГС), имеющий важное функциональное значение в поддержании гомеостаза ЦНС. Участвуя не только в утилизации глутамата, но и в процессах детокси-

кации аммиака, ГС предотвращает чрезмерное накопление этих веществ в синаптических областях и тем самым блокирует нейротоксичность. Снижение активности и уровня ГС выявлено при различных патологических изменениях в головном и спинном мозге (Jayakumar, Norenberg, 2016).

В современных исследованиях, посвященных формированию глутаматергической нервной передачи в период эмбриогенеза, установлено, что рецепторы глутамата присутствуют в спинном мозге мышей на достаточно ранних сроках пренатального развития (ЭД12.5) (Myers et al., 2005), что соответствует примерно 14 сут развития у крыс (Ross et al., 2015). Показано, что в этот же срок глутаматергическая синаптическая система начинает функционировать (Czarnecki et al., 2014). Что касается появления в эмбриогенезе ГС-содержащих клеток, которые должны обеспечивать утилизацию внеклеточного глутамата, в литературе встречаются лишь отдельные работы, которые не касаются собственно СМ (Caldani et al., 1982; Mearow et al., 1989; Tokunaga et al., 2004; Kolos, Korzhevskii, 2018). О распределении и локали-

зации ГС-содержащих клеток в эмбриональной нервной системе млекопитающих на разных этапах развития почти ничего не известно. При этом очевидно, что функциональное значение системы детоксикации глутамата в эмбриональной нервной системе очень велико. Установлено, что нокаутные по гену ГС мыши погибают на ранних сроках эмбрионального развития (ЭД3,5) (He et al., 2007), а гетерозиготы проявляют повышенную восприимчивость к фебрильным судорогам (van Gassen et al., 2009).

Цель настоящей работы – изучить локализацию и морфологические особенности клеток спинного мозга крыс, экспрессирующих глутаминсингтазу, в эмбриональном и в раннем постнатальном периоде с применением имmunогистохимических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались эмбрионы крыс Вистар 12–19 сут развития (ЭД12–ЭД19, $n = 25$), новорожденные крысы (ПД1, $n = 5$). Животных с датированным сроком беременности получали по общепринятому методу (Дыбан и др., 1975). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019). У новорожденных животных и эмбрионов выделяли фрагменты шейного отдела СМ (C_{III} – C_V). Полученный материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида (Korzhhevskii et al., 2015) в течение суток, обезвоживали в спиртах и ксиоле, заливали в парафин. На ротационном микротоме (Rotary 3003 PFM, Германия) изготавливали срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования и регидратации полученных срезов проводили иммуногистохимическое выявление глутаминсингтазы. В настоящем исследовании были использованы моноклональные антитела мыши (клон GS-6, разведение 1 : 400, Merck Millipore (ранее Chemicon), США) и вторичные реагенты из набора EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Визуализацию прореагировавших антител проводили с применением диаминобензидина (DAB+ Dako, Дания). Препараты заключали в среду Cytoseal 60 (Thermo Scientific, Германия). Исследование полученных препаратов и их фотографирование производили при помощи микроскопа LeicaDM750 и фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Анализ и обработку полученных изображений проводили с использованием программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия).

Для флуоресцентной микроскопии с целью выявления ГС-содержащих клеток перед постановкой иммуногистохимической реакции производили тепловое демаскирование антигена в течение 25 мин (99.5°C, в пароварке) в предварительно разогретом до 60°C демаскирующем растворе. В качестве вторичного реагента применяли биотинилированные антитела против мышиных иммуноглобулинов из набора R&D Systems (CTS002, Cell & Tissue staining kit, R&D Systems, США), а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Rhodamine Red-X, (RRX, Jackson ImmunoResearch, США). Для визуализации ядер клеток использовали ядерный краситель SYTOX Green (1 : 100) (Invitrogen, США). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции RRX использовали лазер с длинной 561 нм, для SYTOX Green – 488 нм. Полученные изображения анализировали с применением программ Zen-2012 и LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

С целью оценки специфичности иммуногистохимической и иммунофлуоресцентной реакции на глутаминсингтазу проводили отрицательный и положительный контроль. При исследовании на часть срезов эмбрионального СМ вместо первичных антител наносили разбавитель для антител (S0809) (Dako, Дания). В качестве положительного контроля были использованы астроциты головного и спинного мозга взрослых животных, фиксированных и обработанных таким же образом, как и исследуемый материал. В качестве гистологического контроля использовались препараты эмбрионального СМ 12–19-х сут развития, а также спинного мозга новорожденных животных, окрашенные квасцовыми гематоксилином и толуидиновым синим.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении отрицательного контроля для иммуногистохимической и иммунофлуоресцентной реакции на глутаминсингтазу отмечено, что на срезах эмбрионального СМ отсутствуют клетки и другие структуры, проявляющие иммунопозитивность. Неспецифическое фоновое окрашивание и автофлуоресценция тканей отсутствовали. При проведении положительного контроля иммунопозитивная реакция отмечена в отростчатых клетках, имеющих типичные морфологические признаки астроцитов. При этом нейроны спинного и головного мозга взрослых животных не содержали продукт иммуногистохимической реакции, что подтверждает высокую специфичность метода выявления фермента. Неспецифическое окрашивание и автофлуоресценция отсутствовали.

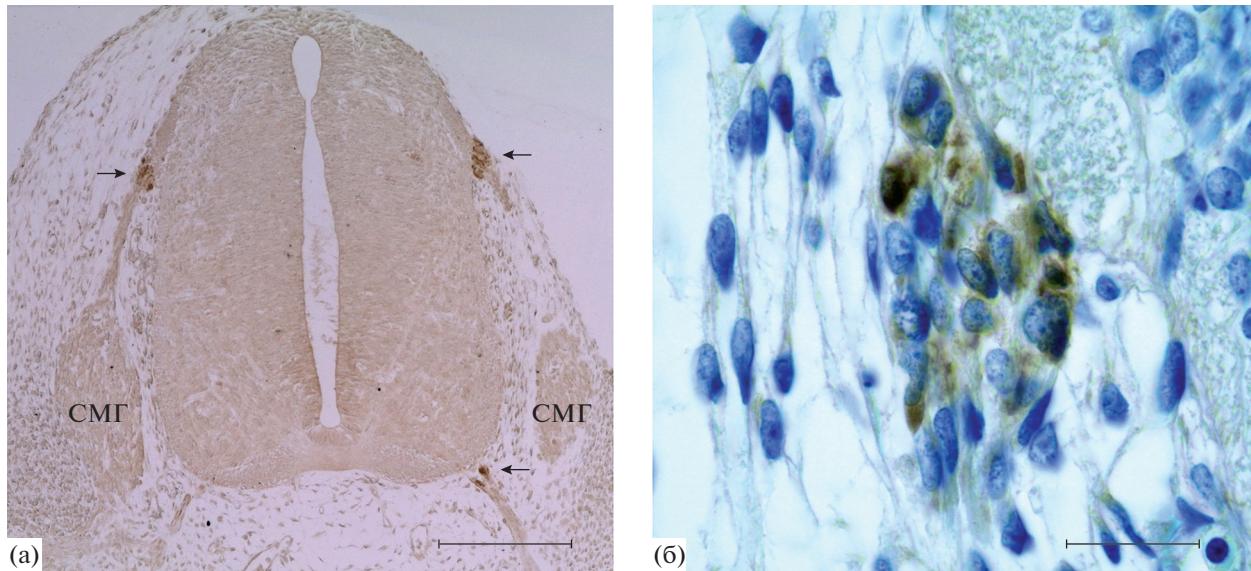


Рис. 1. Поперечный срез шейного отдела спинного мозга эмбриона крысы на 14 сут развития с соответствующими спинномозговыми ганглиями (а) и глутаминсингтаза-содержащие клетки пограничной “шапочки” (boundary cap cells) формирующегося дорзального корешка СМ (б). Стрелки – клетки пограничной “шапочки” (boundary cap cells); СМГ – спинномозговой ганглий. Иммуногистохимическая реакция на глутаминсингтазу (а, б); подкраска толуидиновым синим (б). Масштаб: (а) – 200 мкм, (б) – 20 мкм.

В ходе настоящего исследования при гистологическом анализе формирующегося спинного мозга крысы на разных этапах эмбриогенеза изучали четыре анатомические зоны: крыловидную (алярную) и базальную пластинки, потолочную и донную пластинки.

Установлено, что на ЭД12 в формирующемся спинном мозге ГС-имmunопозитивные клетки отсутствуют. Начиная с ЭД13, в вентральной части СМ эмбрионов крыс идентифицируется тонкий слой округлых нейробластов, дающих начало серому веществу вентральных рогов СМ. На этом сроке также не было выявлено ГС-имmunопозитивных клеток.

На ЭД14 в эмбриональном СМ четко идентифицируются три концентрических зоны: эпендимная, мантийная и маргинальная. В области алярной пластинки формирующегося СМ идентифицируется тонкий слой округлых нейробластов, впоследствии образующих серое вещество задних рогов СМ. Также в дорзальной части СМ начинает формироваться зона входа заднего корешка. В вентрально-латеральной части мантийного слоя базальной пластинки идентифицируются округлые нейробlastы, некоторые из которых имеют отростки, формирующие презумптивные передние корешки СМ. Клетки эмбрионального СМ в этот срок не экспрессируют ГС. В непосредственной близости к зоне входа дорзального корешка и в точках выхода вентральных двигательных нервов, формирующегося СМ идентифицируются скопления округлых клеток –

ток пограничной “шапочки” (boundary cap cells, КПШ). Часть этих клеток экспрессирует ГС (рис. 1).

На 15 сут развития эпендимный слой с плотно расположенными клетками расширяется в дорзальной части СМ и сокращается в базальных пластинках. Мантийный слой формирующегося спинного мозга наиболее развит в вентральной части. Маргинальная зона СМ представлена тонким слоем по периферии формирующегося СМ. В мантийном слое базальной пластинки идентифицируются кластеры молодых мотонейронов и окружающие их вставочные нейробласты. Волокна клеток донной пластинки, достигающие базальной мембранны СМ, формируют презумптивную вентральную срединную борозду. Также в мантийном слое СМ появляются дорзо-вентрально ориентированные комиссулярные нейробласты. Нами отмечено, что на 15 сут развития ГС начинает экспрессироваться в телях большого количества нейроэпителиальных клеток вентральной части эпендимного слоя, причем в области донной пластинки такие клетки отсутствуют. Иммунопозитивные клетки локализуются в области вентральных доменов предшественников СМ (pV0–pV3, pMN) (рис. 2). В ходе настоящего исследования иммунореактивность была отмечена в отростках клеток эпендимной зоны, проходящих через мантийный и маргинальный слой и достигающих пиальной поверхности в вентральной части формирующегося СМ. Иммунореактивность про-

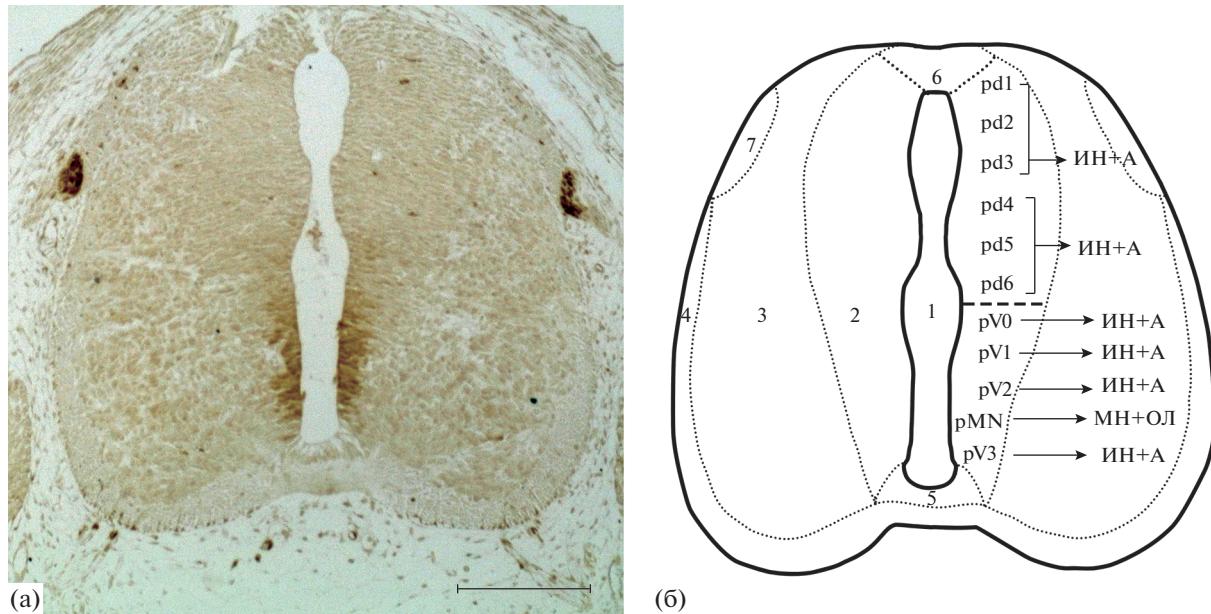


Рис. 2. Глутаминсингтетаза-иммунопозитивные клетки формирующегося шейного отдела спинного мозга эмбриона крысы 15 сут развития (а) и схема поперечного среза СМ с обозначением общепринятого расположения доменов предшественников дорзальной (pd1–pd6) и вентральной (pV0–pV3, rMN) части эпендимного слоя спинного мозга эмбриона крысы (б), генерирующих двигательные нейроны (МН), олигодендроциты (ОЛ), астроциты (А) и различные группы интернейронов (ИН). 1 – центральный канал, 2 – эпендимный слой, 3 – мантийный слой, 4 – маргинальный слой, 5 – донная пластинка, 6 – потолочная пластинка, 7 – зона входа заднего корешка. Иммуногистохимическая реакция на глутаминсингтетазу (а). Масштаб 200 мкм.

являют также субпиальные ножки радиальной глии.

На 15 сут развития в непосредственной близости к зоне входа дорсального корешка и в точках выхода вентральных двигательных нервов формирующегося СМ идентифицируются скопления округлых иммунопозитивных клеток — клеток по-граничной шапочки.

Формирующийся СМ эмбрионов крыс 16–17-х суток развития претерпевает изменения: центральный канал сужается, мантийный слой алярной пластиинки увеличивается в объеме, расширяется маргинальный слой, эпендимный слой алярной пластиинки сужается. В этот период развития количество иммунопозитивных клеток в эпендимном слое увеличивается. Многочисленные ГС-содержащие клетки идентифицируются в вентральной части эпендимного слоя, отдельные клетки эпендимной зоны в дорзальной части СМ также начинают синтезировать фермент. На ЭД16–ЭД17 в мантийном слое базальной пластиинки формирующегося СМ присутствуют немногочисленные иммунопозитивные овальные или веретеновидные клетки, обладающие несколькими отростками с интенсивно окрашенной цитоплазмой. Отростки таких клеток также содержат фермент. Нами также отмечена внутриядерная локализация глутаминсингтетазы в иммунопозитивных клетках эпендимного и мантийного

слоя. В ходе исследования отмечены многочисленные иммунопозитивные отростки, проходящие радиально через мантийный и маргинальный слои базальной пластиинки СМ. Иммунореактивность проявляют также структуры, расположенные непосредственно под оболочками СМ — субпиальные ножки клеток радиальной глии (рис. 3а).

В этот срок в непосредственной близости к зоне входа заднего корешка и зоне выхода аксонов двигательных нейронов формирующегося СМ идентифицируются скопления ГС-иммунопозитивных округлых клеток (рис. 3б).

К 18 сут развития центральный канал формирующегося спинного мозга сокращается, эпендимный слой становится узким. Мантийный слой приобретает конфигурацию серого вещества СМ взрослых животных. Центральный канал сужается, расширяется область формирующегося серого вещества и белого вещества СМ, вентральная и дорзальная борозды, которые делят белое вещество, углубляются. Маргинальный слой расширяется как в вентральной, так и в дорзальной части и его форма приобретает сходство с белым веществом СМ взрослых крыс. Иммунореактивность наблюдается в клетках эпендимного слоя как вентральной, так и дорзальной части СМ. Однако отдельные клетки данной зоны не экспрессируют ГС (рис. 4б). В мантийном слое, преимущественно в вентральной части, выявляется большое ко-

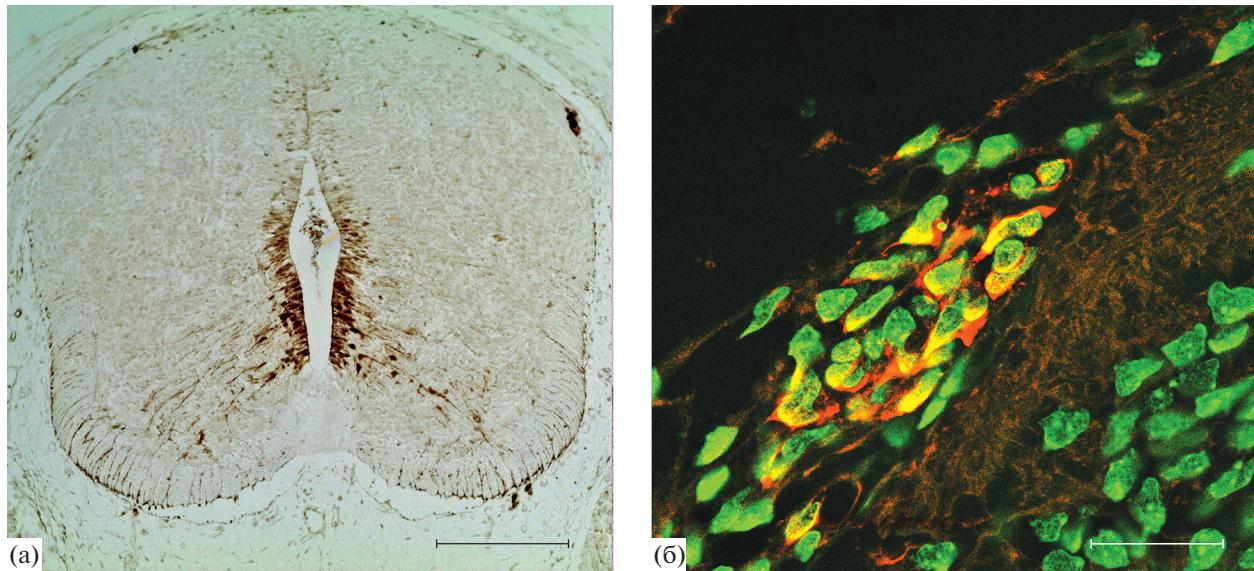


Рис. 3. Поперечный срез шейного отдела спинного мозга эмбриона крысы на 16 сутки развития. (а) – глутаминсинтетаза-имmunопозитивные клетки формирующегося спинного мозга; (б) – клетки пограничной “шапочки” (boundary cap cells) формирующегося заднего корешка спинного мозга. Иммуногистохимическая реакция на глутаминсинтетазу (а); иммунофлуоресцентная реакция на глутаминсинтетазу (Rhodamine Red-X – красное окрашивание) с окраской ядер клеток красителем SYTOX Green (зеленое окрашивание) (б). Масштаб: (а) – 200 мкм, (б) – 20 мкм.

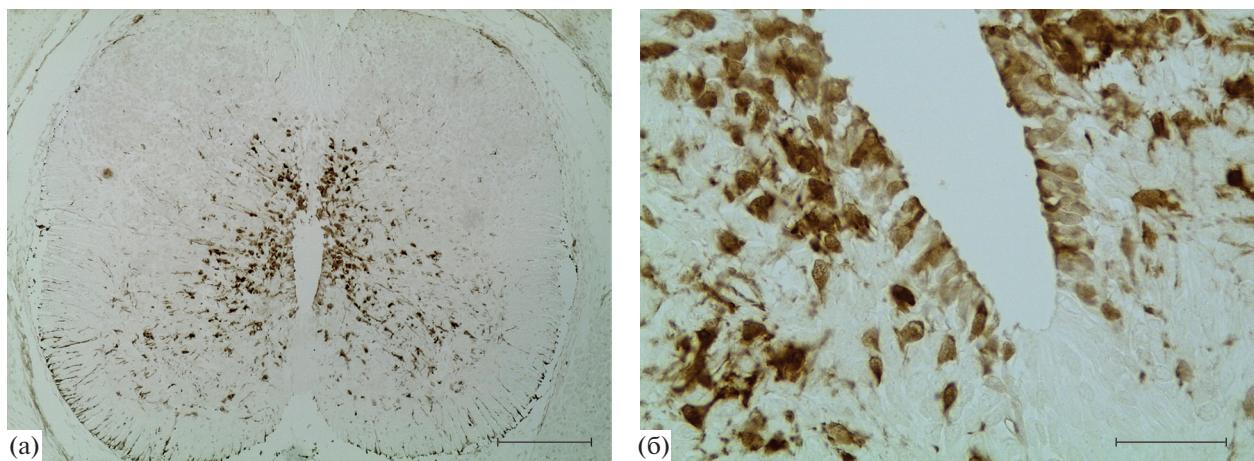


Рис. 4. Поперечный срез шейного отдела спинного мозга эмбриона крысы на 18 сутки развития. Иммуногистохимическая реакция на глутаминсинтетазу. Масштаб: (а) – 200 мкм, (б) – 50 мкм.

личество имmunопозитивных клеток (рис. 4а). Это клетки неправильной формы с двумя или более отростками. В формирующихся передних рогах СМ выявляется большое количество радиально ориентированных имmunопозитивных отростков, проходящих через серое и белое вещество и достигающих пиальной поверхности. В области зоны входа заднего корешка, формирующемся СМ идентифицируются небольшие группы ГС-имmunопозитивных округлых клеток.

На ЭД19 экспрессия ГС наблюдается в клетках эпендимного слоя вентральной и дорзальной ча-

сти СМ. Отдельные клетки данной зоны не экспрессируют ГС. В мантийном слое вентральной и дорзальной части СМ присутствует большое количество отростчатых имmunопозитивных клеток неправильной формы (рис. 5а). Также в формирующемся СМ выявляется большое количество радиально ориентированных имmunопозитивных отростков, проходящих через серое и белое вещество и достигающих пиальной поверхности. Субпиальные ножки астроцитов также содержат ГС (рис. 5б). В области зоны входа заднего корешка формирующемся СМ идентифицируются не-

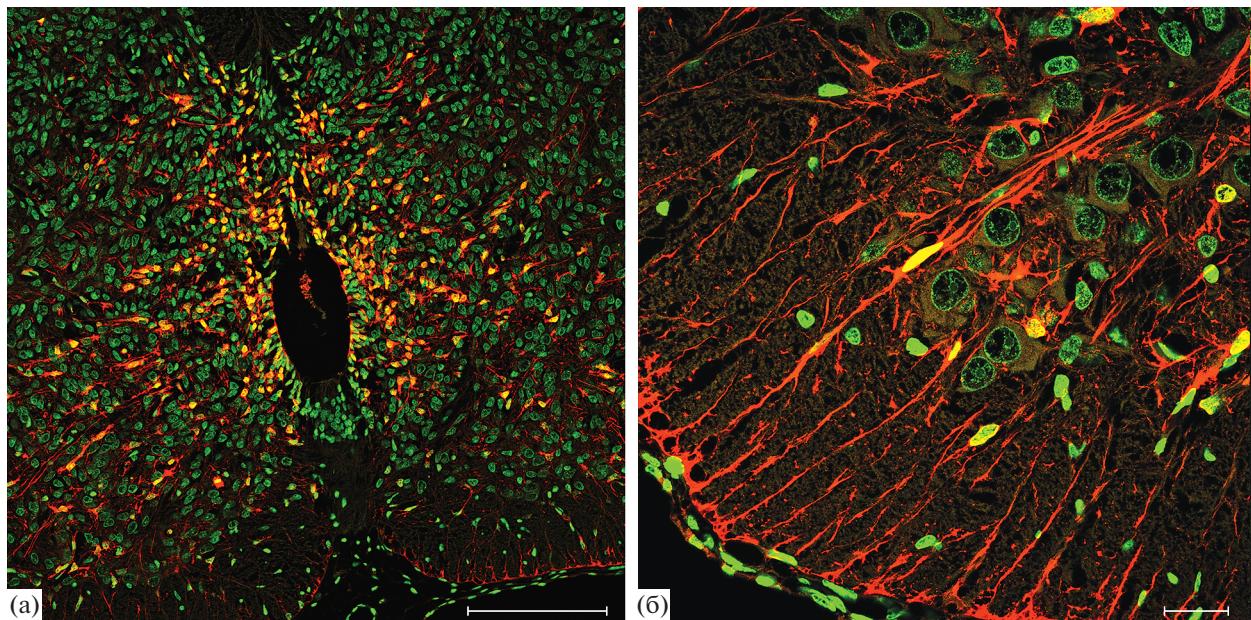


Рис. 5. Глутаминсингтетаза-иммунопозитивные клетки в формирующемся СМ крысы на 19 сутки развития: (а) – общий вид, (б) – фрагмент серого и белого вещества передних рогов СМ. Иммунофлуоресцентная реакция на глутаминсингтетазу (Rhodamine Red-X – красное окрашивание) с окраской ядер клеток красителем SYTOX Green (зеленое окрашивание). Конфокальная лазерная микроскопия. Масштаб: (а) – 200 мкм, (б) – 20 мкм.

большие группы ГС-иммунопозитивных округлых клеток.

После рождения (ПД1) конфигурация СМ приобретает вид СМ взрослых животных. Отчетливо идентифицируются слой эпендими, серое и белое вещество, вентральная и дорзальная борозды, которые делят белое вещество. При проведении иммуногистохимической реакции на ГС в сером веществе СМ новорожденных животных выявляется большое количество звездчатых иммунопозитивных клеток (рис. 6а). Отмечено, что продукт иммуногистохимической реакции локализуется преимущественно в перинуклеарной цитоплазме, часто маскируя ядро. В белом веществе идентифицируется большое количество иммунопозитивных радиально проходящих отростков, а также немногочисленные иммунопозитивные овальные и веретеновидные тела иммунопозитивных клеток с двумя, реже несколькими отростками (рис. 6б). Глутаминсингтетезу содержат также субпиальные ножки астроцитов по перipherии спинного мозга. В эпендимном слое ГС-содержащие клетки отсутствуют. В области зоны входа заднего корешка, формирующегося СМ идентифицируются небольшие скопления ГС-иммунопозитивных округлых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам большого числа исследований известно, что у взрослых животных высокие уровни глутаминсингтетазы, превращающей боль-

шую часть глутамата внеклеточного пространства в глутамин, экспрессируют астроциты. В связи с этим при исследовании ЦНС взрослых лабораторных животных и человека глутаминсингтетаза часто используется как маркер, специфичный для клеток астроглии (Anlauf, Derouiche, 2013). В настоящее время астроциты считаются основными глиальными клетками взрослой ЦНС, выполняющими инактивацию свободного глутамата, предотвращая эксайтотоксичность (Anlauf, Derouiche, 2013; Xin et al., 2019). Несмотря на то, что присутствие фермента в клетках, отличных от астроцитов, вызывает споры, недавние исследования экспрессии ГС во взрослом головном и спинном мозге показали, что отдельные олигодендроциты, нейроны и микроглиоциты способны синтезировать ГС в норме и при повреждении (Liu et al., 2013; Bernstein et al., 2014, 2015; Xin et al., 2019). Вопрос возможности участия различных популяций глиальных клеток эмбриональной ЦНС в детоксикации внеклеточного глутамата и амиака остается до настоящего времени не изученным.

В настоящем исследовании установлено, что ГС начинает экспрессироваться клетками СМ на 15 сут развития. В этот срок фермент обнаруживается лишь в телах клеток в вентральной части эпендимной зоны и их длинных отростках, достигающих пиальной поверхности. Таким образом, иммунопозитивные клетки имеют типичную морфологию клеток радиальной глии. Присутствие ГС в клетках радиальной глии позволяет

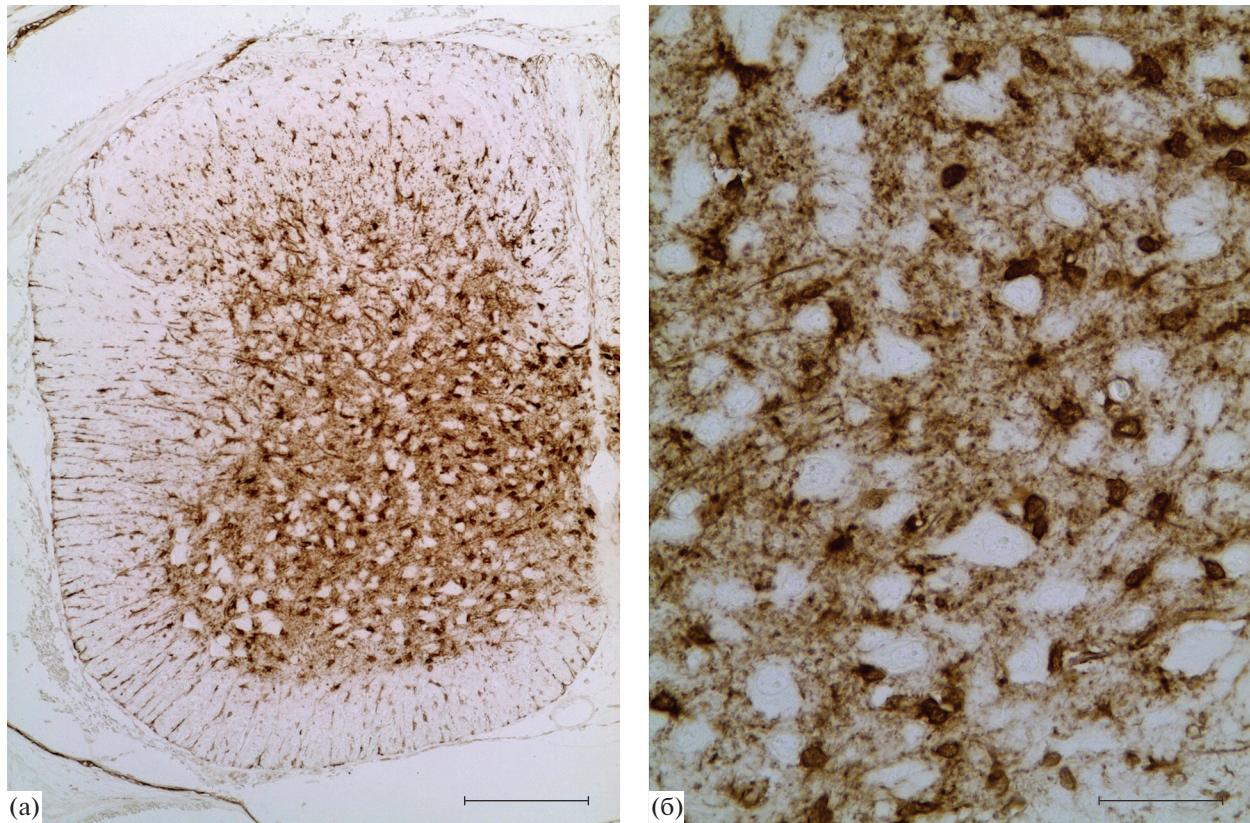


Рис. 6. Глутаминсингтетаза-иммунопозитивные клетки спинного мозга новорожденной крысы: (а) – общий вид, (б) – фрагмент серого вещества передних рогов СМ. Иммуногистохимическая реакция на глутаминсингтетазу. Масштаб: (а) – 200 мкм, (б) – 50 мкм.

предположить, что в период миграции нейробластов, до появления астроцитарной глии, радиальная глия осуществляет защиту клеток от эксайтотоксических уровней глутамата. Появление в этот период (ЭД15) иммунопозитивных структур в субпialной области – ножек радиальной глии, свидетельствует о начале формирования барьера СМ. Присутствие ГС в периваскулярных и субпialных отростках радиальной глии и астроцитов обеспечивает защиту СМ и уменьшает нейротоксичность аммиака, способного свободно проникать через гематоэнцефалический и гематоменингиальный барьер (Suarez et al., 2002; Castegna, Menga, 2018). Известно, что ионы аммония, циркулирующие по кровеносным сосудам головного и спинного мозга, а также в спинномозговой жидкости, поглощаются астроцитами и включаются в амидную группу глутамина. Избыток выделенного астроцитами глутамина может диффундировать из нервной ткани в кровь и церебро-спинальную жидкость (Ott, Larsen 2004; Cooper, 2012; Hawkins, Vina, 2016; Devriendt et al., 2019). Таким образом ГС-содержащие ножки радиальной глии и астроцитов, как элемент глутамин-глутаматной транспортной системы барьера СМ, участвуют в метabolизме азота, защищают от раз-

вития нейротоксичности, предотвращая накопление глутамата и аммиака.

На ранних этапах эмбриогенеза в нервной трубке происходит сегментация нейроэпителия на дискретные домены предшественников различных групп нейронов и клеток глии. Идентификация доменов основана на экспрессии определенного набора транскрипционных факторов, который определяет дальнейшую судьбу предшественников (Lai et al., 2016; Danesin, Soula, 2017; Prochazka et al., 2017). В процессе эмбриогенеза первыми генерируются предшественники нейронов вентральной части СМ. В более позднем эмбриональном периоде (примерно ЭД15 у крыс) эти домены предшественников СМ переключаются на глиогенез. Нами отмечено, что клетки вентральной части эпендимного слоя СМ начинают экспрессировать ГС с 15 сут развития. Исследования показали, что генерация первых предшественников астроцитов в этот период происходит в пределах вентральных доменов pV0, pV1, pV2 и pV3 (Hochstim et al., 2008; Tien et al., 2012). Предшественники олигодендроцитов также начинают формироваться в этот срок из клеток вентральной эпендимной зоны (домен мотонейронов pMN) (Sun et al., 1998; Lu et al., 2000). На следующие сутки развития

(ЭД16), т.е., к концу нейроногенеза в дорзальной части СМ, некоторые клетки дорзального эпендимного слоя в области pd1–pd6 доменов также начинают синтезировать ГС. Таким образом, появление фермента в клетках вентральной и дорзальной части эпендимного слоя коррелирует с переходом от нейроногенеза к глиогенезу. Однако период, когда предшественники астроцитов и олигодендроцитов покидают эпендимную зону не вполне исследован и не определен (Ohayon et al., 2016). Нами отмечено появление немногочисленных ГС-экспрессирующих клеток вне эпендимной зоны, начиная с ЭД16. Можно предположить, что на этих стадиях предшественники астроцитов и/или олигодендроцитов начинают мигрировать из эпендимной зоны и заселяют формирующуюся се-рею вещество СМ. При этом у иммунопозитивных клеток мантийного слоя не прослеживается связь с центральным каналом и мягкой мозговой оболочкой. Таким образом, в этот срок ГС синтезируют как радиальные глиоциты, так и непосредственные предшественники олигодендроцитов и астроглии.

В недавних исследованиях высказывается предположение о влиянии ГС на синаптогенез, в особенности на формировании глутаматергических синапсов развивающегося головного мозга (Son et al., 2019). Было показано, что после подавления активности ГС в период синаптогенеза, у взрослых животных снижается глутаматергическая нейротрансмиссия в области гиппокампа и отмечается нарушение пространственной памяти (Son et al., 2019). Вероятно, ГС-содержащие предшественники астроцитов спинного мозга регулируют синаптогенез в период эмбрионального развития. Данное предположение требует дополнительных исследований.

Долгое время ГС считалась цитозольным ферментом, однако недавние исследования продемонстрировали везикулярное расположение ГС в астроцитах (Anlauf, Derouiche, 2013). В настоящей работе нами было отмечено, что, начиная с ЭД16, в иммунопозитивных клетках эпендимного и мантийного слоя СМ, глутаминсингтаза присутствует как в цитоплазме, так и в ядре клетки, что является неизвестной ранее особенностью.

В настоящем исследовании отмечено присутствие групп иммунопозитивных клеток в областях, прилежащих к зоне входа заднего корешка и к зоне выхода вентрального корешка, начиная с раннего эмбрионального периода развития (ЭД14). Эти области представляют собой особые переходные зоны, образующие условную границу между ЦНС и ПНС. Эта пограничная зона образована ножками радиальной глии и астроцитов (образующих глиальную пограничную мембрану), мозговыми оболочками и специализированным внеклеточным матриксом. Переходные зоны избирательно

проникаемы для аксонов, что обеспечивает связь между ЦНС и ПНС (Suter, Jaworski, 2019). Зоны входа и выхода нервных корешков представляют собой области нервной системы, где клетки ЦНС и ПНС находятся в непосредственном контакте. В период эмбрионального развития для переходных зон в области нервных корешков СМ характерно локальное изменение некоторых компонентов барьера и наличие специализированных клеток – клеток пограничной “шапочки” (boundary cap cells). КПШ являются временной популяцией клеток, но продолжительность их существования в области корешков СМ остается неизвестной. Анализ экспрессии специфических для КПШ маркеров (Krox20, Prss56, Hey2 и Wif1) показал, что эти клетки впервые идентифицируются в дорсальной и вентральной части СМ мышей в период начала входления первых сенсорных аксонов спинномозгового ганглия (СМГ) и выхода двигательных аксонов. Экспрессия этих маркеров сохраняется в КПШ мыши до ЭД16.5 (Coulpier et al., 2009; Radomska, Topilko, 2017). Однако ранние исследования, проведенные с применением электронной микроскопии, демонстрируют, что размер кластеров КПШ уменьшаются с ЭД17 и далее, а полностью исчезают они лишь к ПД6 (Golding, Cohen, 1997; Altman, Bayer, 2001). В настоящем исследовании показано, что КПШ, содержащие ГС, присутствуют в непосредственной близости к зоне входа заднего корешка и зоне выхода аксонов двигательных нейронов, начиная с раннего эмбрионального периода (ЭД14) до рождения. По-видимому, ГС-содержащие КПШ совместно с ГС-иммунопозитивными отростками радиальной глии и астроцитов (пограничной глиальной мембраной) образуют двухсторонний барьер на границе ПНС-ЦНС, препятствующий миграции глиальных предшественников по корешкам в СМ, а также глиальных предшественников и нейробластов спинного мозга на периферию. То есть, КПШ предотвращают преждевременное вторжение астроцитов в зону входа заднего корешка, а астроциты предотвращают вход шванновских клеток в ЦНС (Fontenais, Kucenas, 2017). Функциональное значение экспрессии глутаминсингтазы клетками пограничной шапочки, образующими барьер в пограничной зоне, требует дополнительного исследования. Можно предположить, что ГС-содержащие клетки пограничных зон представляют собой особую популяцию глиальных клеток, обеспечивающую контроль пограничной зоны, аналогично ГС-содержащей пограничной глиальной мембране. Некоторые исследования, выполненные на культурах, предполагают, что во время эмбриогенеза глутамат влияет на рост, ветвление и подвижность растущих аксонов, а также на синаптогенез, когда аксоны достигают своих целевых областей (Kreibich et al., 2004). Ав-

торы выдвигают гипотезу об участии глутамата в модулировании чувствительности конуса роста аксонов к различным молекулам, ответственным за отталкивание растущих аксонов (Kreibich et al., 2004). Стоит отметить, что сенсорные нейроны спинномозгового ганглия являются глутаматергическими клетками и двигательные нейроны передних рогов СМ также способны синтезировать глутамат (Colombo, Francolini, 2019). В период ЭД13–ЭД14 растущие аксоны формирующихся глутаматергических нейронов СМГ направляются к дорсолатеральной части спинного мозга и входят в маргинальный слой СМ через зону входа заднего корешка. Лишь через несколько дней аксоны проникают в мантийный слой. Этот “период ожидания” регулируется репеллентными молекулами (Masuda et al., 2009). Высвобождение глутамата из растущих аксонов СМГ, вероятно, снижает их ответ на молекулы отталкивания. Регуляцию концентрации глутамата, выделяемого растущими аксонами в переходных зонах СМ, могут осуществлять КПШ совместно с пограничной глиальной мембраной. В этот же период растущие аксоны формирующихся мотонейронов, способных синтезировать глутамат, формируют передний корешок и покидают спинной мозг. Некоторые из центральных КПШ образуют длинные тонкие цитоплазматические выросты, которые проникают в эмбриональный СМ, и, охватывая аксоны мотонейронов, направляют их (Radowska, Topilko, 2017). Концентрация же глутамата во внеклеточном пространстве в области входа заднего корешка и в области выхода отростков двигательных нейронов при прохождении аксонами глутаматергических нейробластов пограничной зоны регулируется глутаминсинтетаза-содержащими КПШ и ножками астроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования получены данные по распределению глутаминсинтетазы в клетках спинного мозга крыс на разных сроках эмбрионального и раннего постнатального развития. Установлено, что первые глутаминсинтетаза-содержащие клетки появляются в центральной части эпендимного слоя спинного мозга крысы на 15 сут эмбрионального развития, в период начала глиогенеза. На следующие сутки эмбриогенеза (ЭД16) глутаминсинтетаза-содержащие клетки идентифицируются также в мантийном слое. В этих клетках с помощью двойного флуоресцентного маркирования и конфокальной микроскопии выявлена ядерная локализация фермента.

Впервые установлено, что часть клеток пограничной шапочки (boundary cap cells), расположенной в корешках СМ на границе с ПНС, синтезирует глутаминсинтетазу. Отмечено, что такие

клетки присутствуют в области корешков СМ в период с 14-х сут эмбрионального развития до рождения. Дальнейшие исследования роли глутаминсинтетазы в клетках переходных зон спинного мозга могут внести вклад в понимание их функционирования в период установления связей между ЦНС и ПНС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.А. Колос, Д.Э. Коржевский разработали методику исследования, провели анализ материала, участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С. и др. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus* // Объекты биологического развития. М.: Наука, 1975. С. 505–566.
- Altman J., Bayer S.A. Development of the Human Spinal Cord: An Interpretation Based on Experimental Studies in Animals. N.Y.: Oxford University Press, 2001. 542 p.
- Anlauf E., Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization // Front. Endocrinol. 2013. V. 4. P. 144.
- Bame M., Pentiak P.A., Needelman R., Brusilow W.S. Effect of sex on lifespan, disease progression, and the response to methionine sulfoximine in the SOD1 G93A mouse model for ALS // Gend. Med. 2012. V. 9. № 6. P. 524–535.
- Bernstein H.-G., Bannier J., Meyer-Lotz G. et al. Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial

- lial protein localization // *J. Chem. Neuroanat.* 2014. V. 61–62. P. 33–50.
- Bernstein H.-G., Meyer-Lotz G., Dobrowolny H. et al.* Reduced density of glutamine synthetase immunoreactive astrocytes in different cortical areas in major depression but not in bipolar I disorder // *Front Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 273.
- Caldani M., Rolland B., Fages C., Tardy M.* Glutamine synthetase activity during mouse brain development // *Experientia*. 1982. V. 38. P. 1199–1202.
- Castegna A., Menga A.* Glutamine synthetase: localization dictates outcome // *Genes*. 2018. V. 9. P. E108.
- Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R.* Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture // *J. Neurosci.* 1987. V. 7. P. 357–368.
- Colombo M.N., Francolini M.* Glutamate at the vertebrate neuromuscular junction: from modulation to neurotransmission // *Cells*. 2019. V. 8. № 9. P. 996.
- Cooper A.J.* The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. P. 2439–2455.
- Couplier F., Le Crom S., Maro G.S. et al.* Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers // *Glia*. 2009. V. 57. P. 1450–1457.
- Czarnecki A., Le Corronc H., Rigato C. et al.* Acetylcholine controls GABA-, glutamate- and glycine-dependent giant depolarizing potentials that govern spontaneous motoneuron activity at the onset of synaptogenesis in the mouse embryonic spinal cord // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 6389–6404.
- Danbolt N.C.* Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.* 2001. V. 65. № 1. P. 1–105.
- Danesin C., Soula C.* Moving the Shh source over time: what impact on neural cell diversification in the developing spinal cord? // *J. Dev. Bio.* 2017. V. 5. № 2. P. 4.
- Devriendt N., Or M., Meyer E. et al.* Comparative accuracy and precision of two commercial laboratory analyzers for the quantification of ammonia in cerebrospinal fluid // *Vet. Clin. Pathol.* 2020. V. 49. № 1. P. 119–124.
- Fontenas L., Kucenas S.* Motor exit point (MEP) glia: Novel myelinating glia that bridge CNS and PNS myelin // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. V. 12. P. 333.
- Golding J.P., Cohen J.* Border controls at the mammalian spinal cord: late-surviving neural crest boundary cap cells at dorsal root entry sites may regulate sensory afferent ingrowth and entry zone morphogenesis // *Mol. Cell. Neurosci.* 1997. V. 9. P. 381–396.
- Hawkins R.A., Vina J.R.* How glutamate is managed by the blood brain barrier // *Biology*. 2016. V. 5. P. 37.
- He Y., Hakvoort T.B., Vermeulen J.L. et al.* Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis // *Dev. Dyn.* 2007. V. 236. № 7. P. 1865–1875.
- Hochstim C., Deneen B., Lukaszewicz A. et al.* The spinal cord contains positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain transcriptional code // *Cell*. 2008. V. 133. № 3. P. 510–522.
- Jayakumar A.R., Norenberg M.D.* Glutamine synthetase: Role in neurological disorders // *Adv. Neurobiol.* 2016. V. 13. P. 327–350.
- Kolos E.A., Korzhevskii D.E.* Glutamine synthetase-containing cells of the dorsal root ganglion at different stages of rat ontogeny // *Russ J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. P. 179–183.
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P.* Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *European J. Histochemistry*. 2015. V. 59. № 3. P. 233–237.
- Kreibich T.A., Chalasani S.H., Raper J.A.* The neurotransmitter glutamate reduces axonal responsiveness to multiple repellents through the activation of metabotropic glutamate receptor 1 // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 7085–7095.
- Kulijewicz-Nawrot M., Sykova E., Chvatal A. et al.* Astrocytes and glutamate homoeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex // *ASN Neuro*. 2013. V. 5. P. 273–282.
- Lai H.C., Seal R.P., Johnson J.E.* Making sense out of spinal cord somatosensory development // *Development*. 2016. V. 143. P. 3434–3448.
- Lewerenz J., Maher P.* Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—what is the evidence? // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 469.
- Liu C., Wu W., Zhang B. et al.* Temporospatial expression and cellular localization of glutamine synthetase following traumatic spinal cord injury in adult rats // *Mol. Med. Rep.* 2013. V. 7. P. 1431–1436.
- Lu Q.R., Yuk D., Alberta J.A. et al.* Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system // *Neuron*. 2000. V. 25. P. 317–329.
- Masuda T., Yaginuma H., Sakuma C., Ono K.* Netrin-1 signaling for sensory axons: involvement in sensory axonal development and regeneration // *Cell. Adh. Migr.* 2009. V. 3. P. 171–173.
- Mearow K.M., Mill J.F., Vitkovic L.* The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain // *Mol. Brain Res.* 1989. V. 6. № 4. P. 223–232.
- Miguel-Hidalgo J.J., Waltzer R., Whittom A.A. et al.* Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity // *J. Affect Disord.* 2010. V. 127. P. 230–240.
- Myers C.P., Lewcock J.W., Hanson M.G. et al.* Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits // *Neuron*. 2005. V. 46. № 1. P. 37–49.
- Ohayon D., Garces A., Joly W. et al.* Onset of spinal cord astrocyte precursor emigration from the ventricular zone involves the zeb1 transcription factor // *Cell Rep.* 2016. V. 17. P. 1473–1481.
- Ott P., Larsen F.S.* Blood–brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal // *Neurochem. Int.* 2004. V. 44. P. 185–198.
- Prochazka A., Gosgnach S., Capaday C., Geyer H.* Neuromuscular models for locomotion // *Bioinspired Legged Locomotion* / Ed. Sharbafi M., Seyfarth A. Oxford: Butterworth-Heinemann. 2017. P. 401–453.
- Radomska K.J., Topilko P.* Boundary cap cells in development and disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017. V. 47. P. 209–215.

- Ross E.J., Graham D.L., Money K.M., Stanwood G.D.* Developmental consequences of fetal exposure to drugs: what we know and what we still must learn // *Neuropharmacology*. 2015. V. 40. P. 61–87.
- Son H., Kim S., Jung D.-H. et al.* Insufficient glutamine synthetase activity during synaptogenesis causes spatial memory impairment in adult mice // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. № 1. P. 252.
- Suarez I., Bodega G., Fernandez B.* Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia // *Neurochem. Int.* 2002. V. 41. P. 123–142.
- Sun T., Pringle N.P., Hardy A.P. et al.* Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube // *Mol. Cell. Neurosci.* 1998. V. 12. P. 228–239.
- Suter T.A.C.S., Jaworski A.* Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system // *Science*. 2019. P. 1–8.
- Tien A.C., Tsai H.H., Molofsky A.V. et al.* Regulated temporal-spatial astrocyte precursor cell proliferation involves BRAF signalling in mammalian spinal cord // *Development*. 2012. V. 139. P. 2477–2487.
- Todd A.J., Hughes D.I., Polgar E. et al.* The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 17. P. 13–27.
- Todd A.J.* Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn // *Nat. Rev. Neurosci.* 2010. V. 11. P. 823–836.
- Tokunaga A., Kohyama J., Yoshida T.* Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain // *J. Neurochem.* 2004. V. 90. № 1. P. 142–154.
- van Gassen K.L., van der Hel W.S., Hakvoort T.B. et al.* Hypoxia-insufficiency of glutamine synthetase increases susceptibility to experimental febrile seizures // *Genes Brain Behav.* 2009. V. 8. P. 290–295.
- Xin W., Mironova Y.A., Shen H. et al.* Oligodendrocytes support neuronal glutamatergic transmission via expression of glutamine synthetase // *Cell Rep.* 2019. V. 2. P. 2262–2271.

Glutamine Synthetase in the Cells of the Developing Rat Spinal Cord

E. A. Kolos¹, * and D. E. Korzhevskii¹

¹*Institute of Experimental Medicine, ul. Acad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197367 Russia*

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

The formation of the glutamatergic system of the spinal cord is widely studied. However, there are few studies on the formation of glutamine synthetase-containing structures in the developing spinal cord that protect the nerve cells from the toxic effects of glutamate. In this work, the localization, distribution and morphology of the rat spinal cord (SC) cells expressing glutamine synthetase (GS) were studied in the embryonic and early postnatal periods using immunohistochemical methods. The first cells containing GS were identified in the ventral part of embryonic spinal cord ependymal layer at the onset of gliogenesis – at day 15 (E15). One day later (E16), cells expressing this enzyme are also present in the mantle layer of the embryonic SC. This study shows for the first time that some of the boundary cap cells, located in the transition zone between the SC and the peripheral nervous system, contain glutamine synthetase. The present study made it possible to determine the dynamics of the embryonic spinal cord GS-containing cells formation and to suggest the functional significance of such cells in embryogenesis.

Keywords: glutamine synthetase, spinal cord, embryogenesis, boundary cap cells, astrocytes