

СОДЕРЖАНИЕ

Том 53, номер 6, 2022

ОБЗОРЫ

- Убиквитин-протеасомная система в индукции и поддержании клеточной плюрипотентности
И. В. Зубарев, У. И. Поденкова, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха 401
- Гемопоэтическая стволовая клетка и начальные стадии гемопоэза: методы исследований и современные представления
О. Н. Шевелева, И. В. Лядова 419
- Критические стадии эмбриогенеза злаков: теоретическое и прикладное значение
Н. Н. Круглова, Г. Е. Титова, А. Е. Зинатуллина 437
- Эпителиально-мезенхимальный переход: молекулярные механизмы активации клеток ретинального пигментного эпителия
А. В. Кузнецова 454
-

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- Содержание внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах мыши при развитии *in vivo* и *in vitro*
Т. Н. Игонина, Т. А. Рахманова, И. Н. Рожкова, Е. Ю. Брусенцев, С. Я. Амтиславский 488
- Экспериментальное повышение и понижение уровня серотонина матери изменяет онтогенетические траектории потомков у рыб с эмбриональными диапаузами
В. Б. Борисов, Ф. Н. Шкиль 494
- Влияние разных режимов освещения на некоторые молекулярно-генетические показатели мышечного роста молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в условиях его искусственного воспроизводства
Н. С. Шульгина, М. В. Кузнецова, Н. Н. Немова 512
-

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- Поведение Сертоли-подобных клеток при трансплантации в семенник, лишенный клеток Сертоли
В. В. Мун, А. Ю. Кулибин, Е. А. Малолина 531
-
-

Contents

Vol. 53, No. 6, 2022

REVIEWS

- Ubiquitin-Proteasome System in Cell Pluripotency and Reprogramming
I. V. Zubarev, U. I. Podenkova, A. N. Tomilin, and A. S. Tsimokha 401
- Hemopoietic Stem Cell and Initial Stages of Hemopoiesis: Research Methods and Modern Concepts
O. N. Sheveleva and I. V. Lyadova 419
- Critical Stages of Cereal Embryogenesis: Theoretical and Practical Significance
N. N. Kruglova, G. E. Titova, and A. E. Zinatullina 437
- Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Molecular Mechanism of Retinal Pigment Epithelial Cell Activation
A. V. Kuznetsova 454
-

RESEARCH PAPERS

- Intracellular Lipids during *in vivo* and *in vitro* Preimplantation Embryo Development in Mice
T. N. Igonina, T. A. Rakhmanova, I. N. Rozhkova, E. Yu. Brusentsev, and S. Ya. Amstislavsky 488
- Experimental Increase and Decrease in Serotonin Level of Females Regulate the Developmental Trajectory of Their Offspring in Fish with Embryonic Diapause
V. B. Borisov and F. N. Shkil 494
- The Effect of Different Lighting Regimes on Some Molecular-Genetic Parameters of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Growth under Its Artificial Reproduction Conditions
N. S. Shulgina, M. V. Kuznetsova, and N. N. Nemova 512
-

SHORT COMMUNICATIONS

- The Behavior of Sertoli-Like Cells when Transplanted into Sertoli Cell-Depleted Testes
V. V. Mun, A. Yu. Kulibin, and E. A. Malolina 531
-
-

УДК 576.53

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА В ИНДУКЦИИ И ПОДДЕРЖАНИИ КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

© 2022 г. И. В. Зубарев^{а, #}, У. И. Поденкова^{а, #}, А. Н. Томилин^а, А. С. Цимоха^{а, *}

^аИнститут цитологии РАН, Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г.

Принята к публикации 26.06.2022 г.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) происходят из ранних эмбрионов на этапе предимплантационной бластоцисты и способны дифференцироваться во все типы соматических клеток. Открыты позднее индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), имеющие схожие с ЭСК характеристики, также представляют собой удобную модель для изучения раннего эмбрионального развития млекопитающих и также перспективны для клеточной терапии различных заболеваний, связанных с клеточной и тканевой дисфункцией. Понимание механизмов, лежащих в основе самообновления и дифференцировки, а также репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние, крайне важно для успешного и безопасного использования ЭСК и иПСК в терапии. Одним из ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе обеспечения жизнедеятельности клетки, является деградация белков, опосредованная убиквитин-протеасомной системой (УПС). Настоящий обзор посвящен роли УПС в поддержании плюрипотентности и его индукции посредством регуляции ключевых факторов.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, протеасома, протеолиз, убиквитин-протеасомная система, эмбриональные стволовые клетки

DOI: 10.31857/S047514502206009X

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) — это один из первых охарактеризованных типов плюрипотентных стволовых клеток (ПСК), обладающие способностью дифференцироваться во все типы соматических клеток организма. ЭСК выделяют на этапе предимплантационной бластоцисты из внутренней клеточной массы (ВКМ) (Thomson et al., 1998). В настоящее время при соблюдении определенных условий ЭСК возможно культивировать неограниченное время *in vitro*. При этом они сохраняют свои свойства к самоподдержанию в недифференцированном состоянии и к дифференцировке. Известно, что ЭСК обладают способностью противостоять повреждающим факторам (Vilchez et al., 2014) и имеют повышенную устойчивость к повреждениям генома и пониженную частоту мутаций, продуцируют гораздо меньше радикалов кислорода по сравнению с дифференцированными клетками (Sinenko et al., 2021). Такие свойства ЭСК обеспечиваются усиленной активностью защитных систем клетки, включая системы поддержания протеостаза, одной из которых является убиквитин-

протеасомная система (УПС) деградации белков. На долю УПС приходится большая часть регулируемого протеолиза в клетке и, тем самым, УПС является участником многих клеточных процессов, включая поддержание и индукцию плюрипотентности (Buckley et al., 2012; Okita, Nakayama, 2012; Vilchez et al., 2012; Selenina et al., 2017; Choi, Baek, 2018; Noormohammadi et al., 2018). В данной обзорной работе обобщены имеющиеся на сегодняшний день данные о роли компонент УПС в поддержании клеточной плюрипотентности и ее индукции в результате соматического репрограммирования. Также обсуждаются механизмы регуляции экспрессии и активности четырех репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc в результате их убиквитинирования и последующей деградации посредством УПС.

ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ (ПСК)

Научившись “удерживать” ЭСК в плюрипотентном состоянии *in vitro*, исследователи получили новые возможности для изучения этих клеток и более подробного изучения механизмов поддержания плюрипотентности, равно как и

[#] Авторы внесли равный вклад в подготовку статьи.

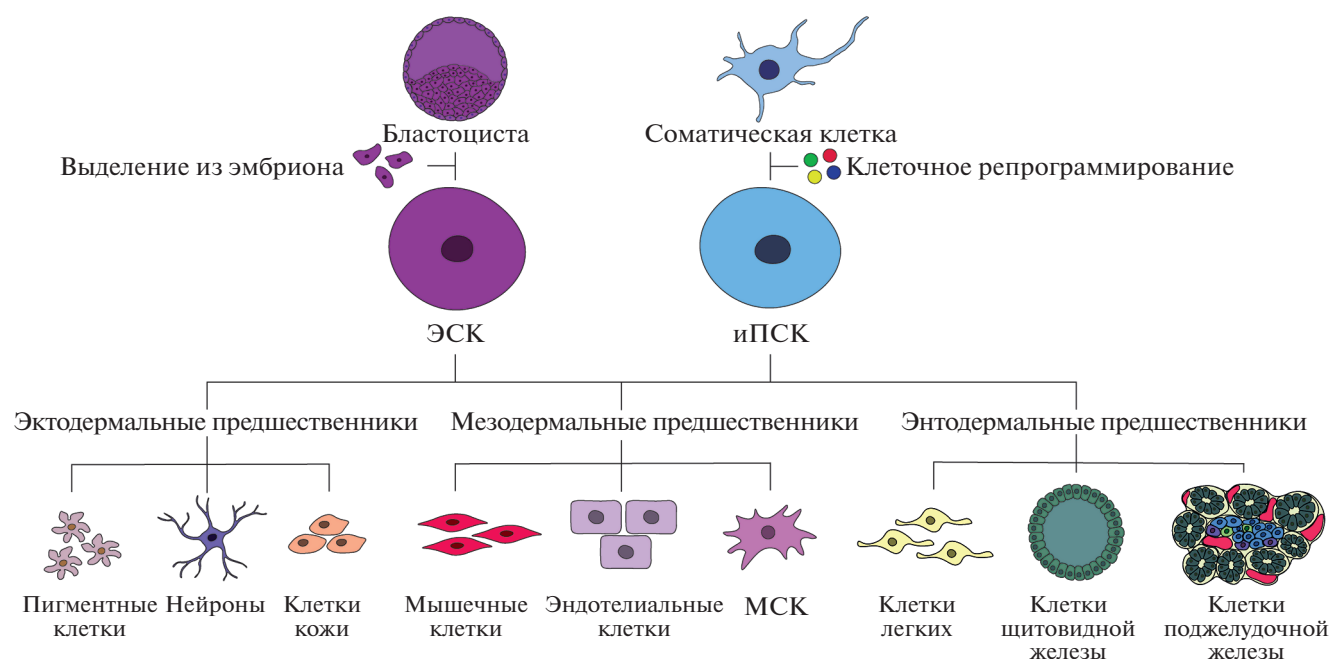


Рис. 1. Потенциал дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК).

выхода из нее, в том числе с помощью модуляции функций отдельных генов. Помимо этого, ЭСК активно используют при разработке лекарств и/или моделировании заболеваний человека, поскольку комплексное представление о биологических процессах, лежащих в основе той или иной патологии человека, имеет решающее значение для разработки стратегии их профилактики и лечения. Существует, однако, много практических проблем, которые ограничивают использование ЭСК в клеточной терапии (Yamanaka, 2020), главная из которых связана с их получением, а именно с этическими вопросами использования человеческих эмбрионов для получения ЭСК. Еще одна сложность в использовании ЭСК в медицине связана с иммунным отторжением аллогенных ЭСК после трансплантации в поврежденную ткань пациента (Swijnenburg et al., 2008), а также с риском образования опухолей (тератом) (Amariglio et al., 2009). Решением этического вопроса и проблемы отторжения аллогенных ЭСК виделось создание ЭСК-подобных клеток из собственных соматических клеток пациента за счет переноса ядра (Wilmot et al., 1997) или слияния соматических клеток с ЭСК (Ying et al., 2002). Одновременно с попытками получения ЭСК-подобных клеток возникла идея об индукции клеточной плюрипотентности в соматических клетках, основанная на обратимости дифференцировки клеток животных, поскольку ДНК клеток взрослого организма по-прежнему содержит всю необходимую генетическую информацию (Gurdon, 1962). На основе данной гипотезы среди факторов, под-

держивающих клеточную плюрипотентность в ЭСК мыши, был произведен поиск и были выявлены четыре фактора (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc), сверхэкспрессия которых была способна индуцировать плюрипотентность у эмбриональных фибробластов мышей (Takahashi, Yamanaka, 2006). Клетки, полученные при помощи ретровирусной трансдукции данных факторов, во многих аспектах напоминали ЭСК, включая морфологию, пролиферацию, экспрессию маркеров плюрипотентности, профили экспрессии генов, эпигенетический статус. Также как и ЭСК, полученные клетки обладали способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков (эктодерму, мезодерму и энтодерму) (рис. 1) и, в конечном итоге, во все клеточные типы взрослого организма. Данные клетки получили название “индуцированные плюрипотентные стволовые клетки”, иПСК (Takahashi, Yamanaka, 2006). Спустя год после получения иПСК мыши были получены иПСК человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Технология генетического репрограммирования оказалась легче и качественнее, чем ядерное клонирование, и, тем самым, сильно повысила ожидания в отношении применения иПСК в биомедицине. Во-первых, использование собственных соматических клеток пациента для получения иПСК обуславливает высокий уровень персонализации данных клеток для клеточной терапии, в том числе и для тестирования различных лекарственных препаратов *in vitro*. Во-вторых, иПСК можно получить из любых жизнеспособных

клеток с функционирующим ядром, включая периферические клетки крови, которые легко замораживать и хранить долгое время (Loh et al., 2009). На сегодняшний день самая востребованная область, в которой используются иПСК, это тестирование лекарств и моделирование заболеваний человека. В частности, удалось смоделировать некоторые типы опухолей (глиомы) (Stricker et al., 2013; van Pel et al., 2018), несколько моногенных кардиозаболеваний (Moretti et al., 2010; Ma et al., 2013) и других заболеваний человека (Miyazaki et al., 2018; Stoddard-Bennett, Reijo Pera, 2019). Кроме того, с использованием иПСК были успешно смоделированы многие генетические нарушения, включая хромосомные и моногенные заболевания, такие как синдром Дауна (Briggs et al., 2013) и синдром Тернера (Li et al., 2012), а также сложные расстройства, включая расстройства аутистического спектра (DeRosa et al., 2012) и шизофрению (Brennand et al., 2011). Использование иПСК позволяет получать специфический для заболевания фенотип и тестировать на нем лекарственные препараты как на положительный эффект, так и на токсичность, например, на кардиотоксичность.

В области применения иПСК для клеточной терапии, как и в случае ЭСК, на данный момент имеется ряд проблем, препятствующих их широкому использованию в биомедицине. Во-первых, получение иПСК — это времязатратная технология, что исключает применение этих клеток в ситуации, когда пациенту требуется срочная помощь. Второй проблемой является туморогенность, которая ассоциирована как с присутствием остаточных иПСК, так и с появлением туморогенного дифференцированного потомства. Последняя проблема обусловлена тем что у части иПСК, которые подвергаются направленной дифференцировке в какой либо клеточный тип может сформироваться неправильный паттерн генов, приводящий к злокачественным образованиям при трансплантации (Lee et al., 2013). Еще один аспект туморогенности иПСК обусловлен возникновением мутаций в процессе культивирования и/или дифференцировки иПСК еще до их трансплантации в ткани пациента (Rouhani et al., 2016; Merkle et al., 2017). Кроме того, проблема ассоциирована с онкогенной активностью самих факторов репрограммирования (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc), особенно c-Myc, который является одним из наиболее часто мутирующих генов при раке человека и часто действует как драйвер мутации (Okita et al., 2007; Miller et al., 2012). Другая проблема в использовании иПСК связана с тем что каждая линия иПСК не идентична другой: они отличаются морфологией, кривыми роста, паттернами экспрессии генов и склонностью к дифференцировке в различные типы клеток (Osafune et al., 2008). Даже при аутологичной трансплантации иПСК существуют проблемы с иммунологическим отторжением (Deuse et al.,

2019). К тому же иПСК на данный момент более эффективны для моногенных заболеваний и их сложно применять для лечения полигенных и заболеваний неизвестной природы (Doss, Sachinidris, 2019).

Для реализации потенциала иПСК в клеточной терапии необходимо всестороннее исследование самой природы клеточной плюрипотентности, в том числе роли внутриклеточных систем, поддерживающих это состояние, одной из которых является регулируемый протеолиз. Убиквитин-протеасомная система (УПС) деградации белков осуществляет большую часть регулируемого протеолиза в клетке, осуществляя регуляцию многих клеточных процессов, включая поддержание и индукцию плюрипотентности (Buckley et al., 2012; Okita, Nakayama, 2012; Vilchez et al., 2012; Selenina et al., 2017; Choi, Baek, 2018; Noor-mohammadi et al., 2018).

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА (УПС)

Жизнеспособность и функционирование клетки напрямую зависит от качества клеточного протеома, которое определяется строгой регуляцией равновесия между синтезом и деградацией белковых молекул. Неправильно сложенные, поврежденные или уже отыгравшие свою роль белки должны быть распознаны и удалены. Удаление белков осуществляется посредством протеолитической деградации в ходе работы лизосомной (Delevoe et al., 2019) и убиквитин-протеасомной (Chondrogiani, Gonos, 2012) систем. В то время как основной задачей лизосомной системы является деградация внутриклеточных органелл и крупных белковых структур, убиквитин-протеасомная система (УПС) является наиболее важной в отношении распознавания и удаления поврежденных и короткоживущих белков. Предполагается, что от 70 до 90% неправильно свернутых, поврежденных или отработанных белков деградирует через протеасомный путь (Jung, Grune, 2012). Протеасомная система является эволюционно-древним механизмом протеолитической внутриклеточной системы регуляции протеома клетки и присутствует у некоторых архей (например, *Thermoplasma acidophilum*), а также у всех животных и растений.

Центральным компонентом УПС является мультисубъединичный протеолитический комплекс — 20S-протеасома, — а также несколько различных регуляторов, которые могут изменять активность и специфичность 20S-протеасомы (Konstantinova et al., 2008). 20S-протеасома имеет форму полого бочонка, состоящего из семи различных α - и β -субъединиц, расположенных в виде четырех гептамерных колец ($7\alpha, 7\beta, 7\beta, 7\alpha$), общей массой 700 кДа (рис. 1). Внешние α -кольца образуют

своего рода ворота, которые отвечают за регуляцию входа субстрата во внутреннюю протеолитическую камеру. Именно внутренние β -кольца отвечают за протеолитическую активность протеасомы, формируя протеолитическую камеру с каталитическими центрами на трех различных β -субъединицах: $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ (Glickman, Ciechanover, 2002). Субъединица $\beta 1$ обладает каспазаподобной активностью, расщепляя белки после кислых аминокислот, $\beta 2$ имеет трипсин-подобную активность и расщепляет белки после основных аминокислот и $\beta 5$ обладает химотрипсин-подобной активностью, расщепляя пептиды после гидрофобных аминокислот (Jung, Grune, 2012).

У млекопитающих при индукции IFN- γ происходит замена конститутивных каталитических субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ индуцибельными субъединицами $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$, и в результате формируется специфическая 20S-протеасома – иммунопротеасома, что приводит к эффективной генерации пептидов, представляемых комплексами МНС класса I. В дополнение к стандартным 20S-протеасомам и иммунопротеасомам было идентифицировано несколько тканеспецифичных видов 20S-комплексов, в том числе тимопропротеасома и сперматопротеасома (Kniepert, Groettrup, 2014). 20S-частицы в тимусе преимущественно содержат специфическую субъединицу $\beta 5t$ и, как полагают, в первую очередь это связано с генерацией антигенных пептидов для положительной селекции Т-лимфоцитов (Murata et al., 2007). Специфическая 20S-протеасома семенников млекопитающих содержит альтернативные субъединицы $\alpha 4s$ и участвует в деградации ацетилованных гистонов при сперматогенезе и репарации ДНК (Zhong, Belote, 2007; Qian et al., 2013).

Наиболее важным регулятором 20S-протеасомы является 19S-комплекс (или PA700). Схематически 19S-регулятор можно представить в виде кольцеобразного основания и крышки (рис. 2). Основание связывается с внешними α -кольцами 20S-коровой частицы и его основной функцией является открытие ворот, сформированных α -кольцом, разворачивание белка и пропускание его в каталитическую полость 20S-протеасомы. Крышка 19S-регулятора распознает и связывает полиубиквитинированные белки, с последующим деубиквитинированием (Tanaka, 2009). 20S-частица может взаимодействовать с одним или двумя 19S-регуляторами и, таким образом, формировать 26S- или 30S-протеасому соответственно.

Другой регуляторной частью, способной связываться с 20S-протеасомой является PA28-регулятор (или 11S). PA28 состоит из трех различных субъединиц (PA28 α , PA28 β и PA28 γ), которые могут располагаться между собой в различных комбинациях, однако, в клетках существует лишь две формы PA28: PA28 $\alpha 4/\beta 3$, и PA28 $\gamma 7$ (Huber,

Groll, 2017; Stohwasser, 2018). Данные комплексы PA28 способны связываться с внешними α -кольцами 20S-протеасомы и изменять свойства деградации субстрата (рис. 2). Однако, как и протеолиз свободной 20S-протеасомой, деградация субстратов протеасомным комплексом PA28–20S не зависит от АТФ. Функции PA28 $\alpha\beta$ способствуют высвобождению пептидных продуктов протеасомами, оптимизируя процесс презентации антигена МНС-I для поддержки адаптивных иммунных реакций организма. Интересно, что PA28 γ имеет преобладающую ядерную локализацию и участвует в регуляции нескольких важных клеточных процессов, включая рост и пролиферацию клеток, апоптоз, структуру и организацию хроматина, а также ответ на повреждение ДНК. Кроме того, PA28 $\alpha\beta$ и, в меньшей степени, PA28 γ значительно повышают способность 20S-протеасомы селективно расщеплять окисленные белки (Pickering, Davies, 2012).

Существует еще один регулятор активности протеасом – белок PA200 массой около 200 кДа, имеющий слегка асимметричную куполообразную структуру с внутренней полостью, которая находится на одном или обоих α -кольцах 20S-протеасомы (Ortega et al., 2005) (рис. 2). Точные функции PA200 до сих пор не ясны, однако известно, что PA200 преимущественно находится в ядре, и может играть роль в инициации репарации ДНК, а также при сперматогенезе (Ustrell et al., 2002; Khor et al., 2006).

Описан также адаптерный белок Ecm29 (рис. 2) с мол. массой около 200 кДа, который связываясь с 26S-протеасомой, может присоединять ее к различным клеточным компартментам, включая эндосомы, эндоплазматический ретикулум и везикулярно-тубулярный кластер, играя роль в элиминации неправильно сложенных белков посредством деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом (ERAD) и/или в другом протеолизе (Gorbea et al., 2004). Интересно, что Ecm29 также ответственен за ремоделирование 26S-протеасомы в клетках человека в ответ на окислительный стресс (Wang et al., 2017).

Еще один адаптерный белок PI31 (*PSMF1*) с массой порядка 30 кДа играет важную роль в контроле за функционированием протеасомы (рис. 2). Показано, что PI31 ингибирует 20S-протеасомы *in vitro* (McCutchen-Maloney et al., 2000), но способствует расщеплению белка *in vivo* (Bader et al., 2011; Yang et al., 2016). PI31 блокирует также АТФ-зависимую сборку 26S-протеасомы *in vitro*, но не оказывает влияния на активность *in vitro* уже собранной 26S-протеасомы (Li et al., 2014b). Согласно другим данным, рибозилирование PI31 способствует сборке 26S-протеасомы (Cho-Park, Steller, 2013). Важно отметить, что показана роль

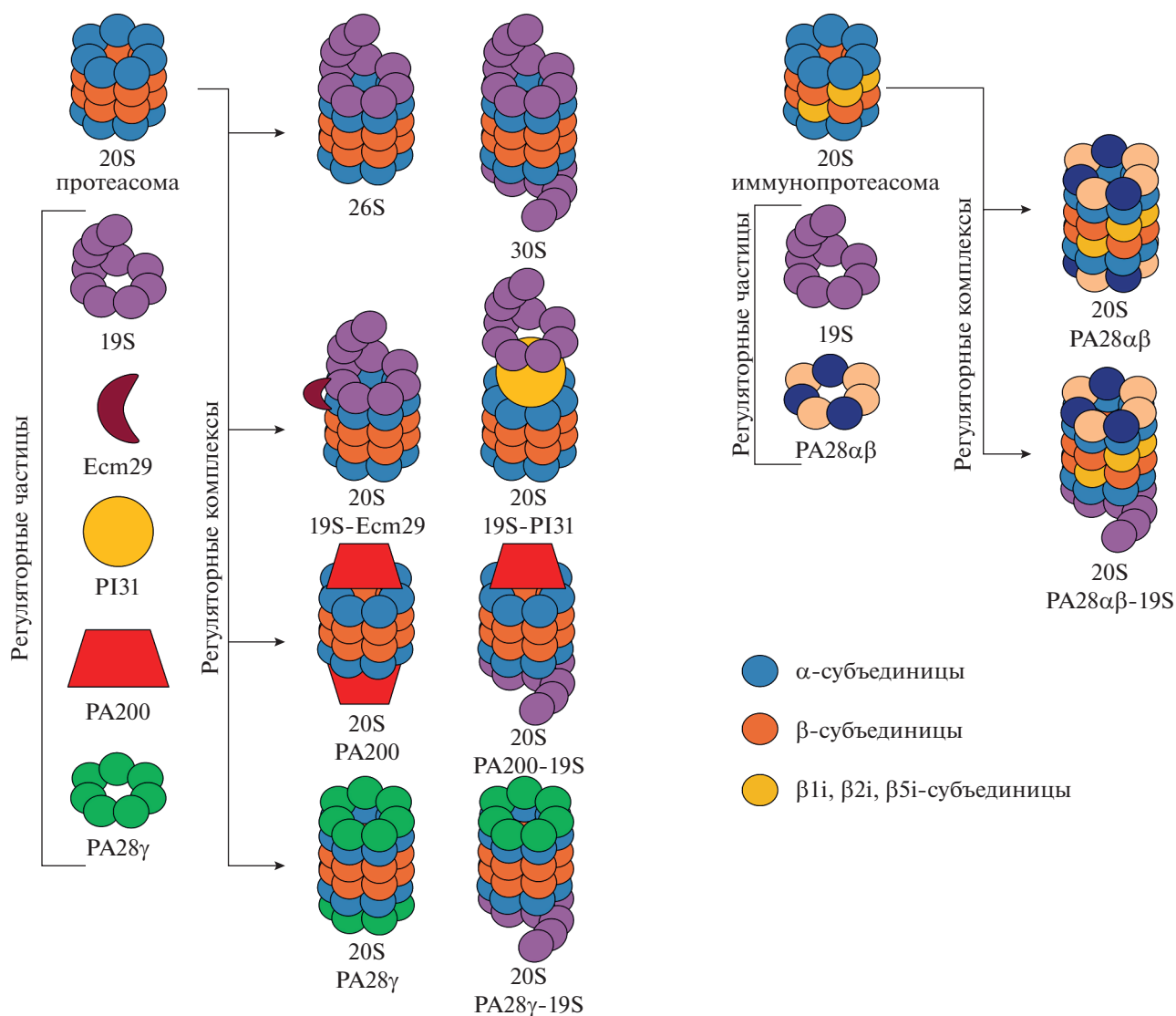


Рис. 2. Схематическое изображение протеасомы и протеасомных регуляторов.

PI31 в транспорте протеасом в аксонах, и что он необходим для развития синапсов (Liu et al., 2019).

Помимо связывания с каким-то определенным регулятором 20S-протеасома может связываться сразу с различными регуляторами и образовывать гибридную протеасому (рис. 2). Хотя точная клеточная функция гибридных протеасом до сих пор неизвестна, предполагается, что протеолитическая специфичность 20S-протеасомы, связанной с одной 19S-частицей, изменяется за счет связывания дополнительного регулятора, что приведет к формированию другого набора олигопептидных продуктов.

Протеасомная деградация опосредуется в основном полиубиквитинированием субстрата на основе лизина в 48 положении в качестве конъюгированного остатка, хотя цепи, основанные на

лизинах в других положениях, также могут участвовать в нацеливании белков на протеасому (Saeki et al., 2009; Xu et al., 2009b). Мечение белков путем ковалентного присоединения убиквитина к белковым субстратам представляет собой многоступенчатый процесс, управляемый последовательным действием трех типов ферментов: убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3) (Chondrogianni, Gonos, 2012). Реакция начинается с фермента, активирующего убиквитин (E1), который первоначально аденилирует С-концевой остаток глицина молекулы убиквитина, и затем образует тиоэфирную связь между активированным остатком глицина и остатком цистеина на каталитическом сайте E1 посредством АТФ-зависимого механизма с получением реакционноспособного промежуточного тиоэфира E1-убиквити-

на. Активированный убиквитин впоследствии передается одному из ряда отдельных убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) путем трансстиоляции в консервативный цистеин активного центра E2. Третий этап включает специфическую убиквитин-лигазу (E3), которая рекрутирует целевой белок и опосредует перенос активированного убиквитина от фермента E2 к субстрату. Полиубиквитиновая цепь наращивается добавлением другой молекулы убиквитина к лизину в 48 положении уже присоединенной молекулы убиквитина. В то время как E1 фермент является высоко консервативным белком, E2 представлены в большом количестве, а E3 очень вариативны, что обеспечивает высокую адаптивность системы убиквитинирования под различные белки-мишени (Dikic, Robertson, 2012). Следующим этапом является узнавание и транспортировка меченого белка к 26S протеасоме, после чего убиквитиновые мономеры высвобождаются с помощью деубиквитирующих ферментов (DUB) и далее рециркулируются, а белковый субстрат разворачивается и проталкивается во внутреннюю протеолитическую полость 20S-протеасомы. В протеолитической полости 20S-протеасомы субстрат расщепляется на короткие пептиды, которые могут отображаться на поверхности клетки для иммунного надзора или подвергаться окончательному протеолизу до свободных аминокислот различными аминопептидазами и, таким образом, использоваться для синтеза других белков (Glickman, Ciechanover, 2002) (рис. 3).

УПС В КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

ЭСК и иПСК, как было отмечено выше, демонстрируют поразительную способность к непрерывной репликации при отсутствии старения. Несмотря на имеющиеся у нас знания о ПСК, механизмы, которые регулируют их плюрипотентность и дифференцировку, а также репрограммирование, остаются в значительной степени неизвестными. Накопленные за последние годы данные подчеркнули важность протеостаза в поддержании плюрипотентности ПСК и выхода из нее в процессе дифференцировки, а следовательно, и роль УПС, как одного из ключевых игроков протеостаза в клетке.

Появляется все больше свидетельств того, что перекрестная регуляция ключевых факторов транскрипции за счет E1-E2-E3 и DUB-ферментов контролирует такие функции стволовых клеток, как плюрипотентность, дифференцировка и репрограммирование. E1-E2-E3 ферменты убиквитируют ключевые белки, связанные со стволовостью, и, тем самым, регулируют дифференцировку ПСК, тогда как DUB-ферменты, удаляя молекулы убиквитина у этих белков, удерживают

их от протеасомной деградации и, тем самым, предотвращают дифференцировку (Ramakrishna et al., 2014). Таким образом, баланс между убиквитинированием и деубиквитинированием ключевых регуляторов ПСК определяет судьбу этих клеток.

Известно, что E2-убиквитин-конъюгирующий фермент Ube2S напрямую взаимодействует с Sox2, регулируя его уровень посредством убиквитинирования и поддерживая, таким образом, недифференцированное состояние ЭСК мыши (Wang et al., 2016). Кроме того, E2-фермент поддерживает недифференцированное состояние ЭСК мыши посредством индукции еще одного ключевого маркера самообновления – Esrrb. Сверхэкспрессия Ube2s в ЭСК мыши в дополнение к Esrrb также приводила к повышению уровней Nanog, Lin28 и Sall4, что наводит на мысль, что индуцированная экспрессия данных факторов может компенсировать сниженный уровень Sox2 для поддержания клеток в плюрипотентном состоянии.

E3-убиквитин-лигаза Wwp2 убиквитирует белок плюрипотентности Oct4 в ЭСК как мыши, так и человека (Xu et al., 2004; Xu et al., 2009a). Интересно, что нарушение опосредованного Wwp2 убиквитинирования Oct4 значительно повышало эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши (Li et al., 2018). Также лигаза Wwp2 специфически взаимодействует с Set7-метилованным Sox2 и индуцирует убиквитинирование и деградацию Sox2 в ЭСК мыши, которым может противодействовать Akt1-опосредованное фосфорилирование (Fang et al., 2014). Активность Akt1 доминирует над Set7, поддерживая стабильность экспрессии Sox2 и плюрипотентность в ЭСК (Fang et al., 2014; Wang et al., 2019).

В исследовании с использованием скрининга интерферирующих РНК, нацеленных на компоненты УПС, было показано, что благодаря работе УПС поддерживается некий баланс, в котором DUB-ферменты Rpn11 (PSMD14) и Usp9X, а также E3-убиквитин-лигазы Rbx1, Rfdw2, Rnf12, Ubr5, Ddb1, Trim28 и Phf5a способствуют самообновлению ЭСК, тогда как другие убиквитин-лигазы – Fbw7, Rnf152, Rnf31, Rnf8, SOCS3, Topors, Rnf36, DR3/TNFRSF25 и убиквитин-подобный белок Ubl5 – регулируют раннюю дифференцировку ЭСК (Buckley et al., 2012). Нарушение активности DUB Rpn11 в составе протеасомы ведет к выходу из состояния плюрипотентности ЭСК, в то время как его сверхэкспрессия ингибирует дифференцировку этих клеток, поддерживая их плюрипотентное состояние (Buckley et al., 2012). Другая DUB, Usp21, поддерживает устойчивость ЭСК за счет стабилизации Nanog (Jin et al., 2016; Kwon et al., 2017). Для DUB Usp22 также показана критическая функция в раннем эмбриональном

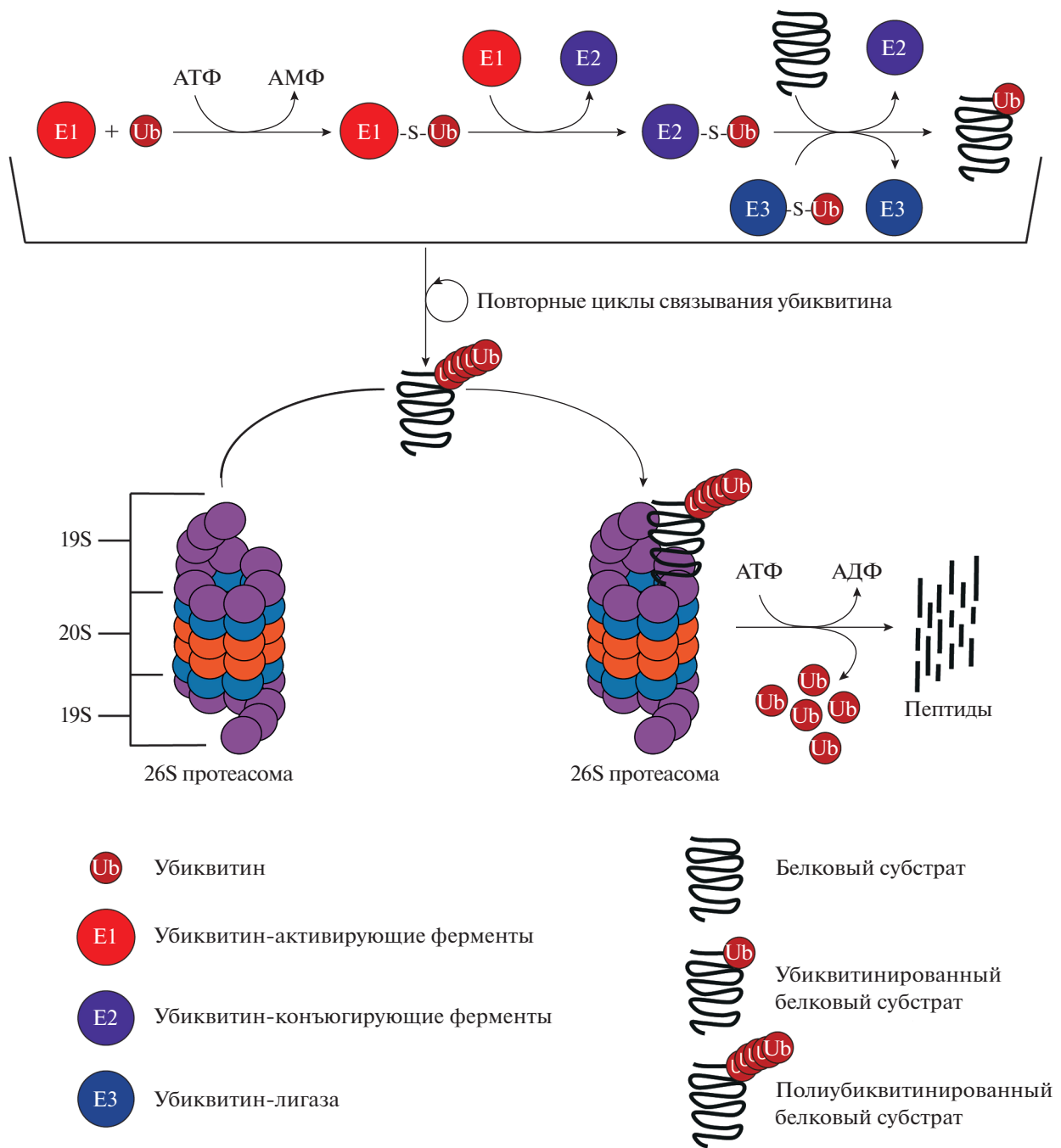


Рис. 3. Схематичное изображение убиквитин-зависимой деградации белкового субстрата протеасомой после ковалентного присоединения убиквитина (Ub) АТФ-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3).

развитии мышей за счет стабилизации NAD-зависимой гистондеацетилазы Sirt1, которая вызывает снижение уровней ацетилирования p53 и подавление функций, опосредованных p53 (Lin et al., 2012). E3-лигаза Fbw7/Fbxw7 действует как ключевой регулятор плюрипотентности и дифференцировки ЭСК посредством регуляции стабильности с-Мус. Интересно, что нокаун Fbxw7 в ЭСК мыши, вызывал стабилизацию с-Мус, но не ока-

зывал эффект на факторы плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 (Buckley et al., 2012). Также было продемонстрировано, что Ddb1, компонент E3-лигазного комплекса Cul4-Ddb1, вносит вклад в регуляцию плюрипотентности, так как нокаун Ddb1 приводил к понижению уровней факторов плюрипотентности Nanog и Oct4, а также к усилению регуляции генов, связанных с дифференцировкой ЭСК (Buckley et al., 2012; Gao

et al., 2015). E3-лигаза March5 также участвует в поддержании плюрипотентности ЭСК мыши (Gu et al., 2015). Лигаза Rnf12/RLIM контролирует судьбу ЭСК мыши, помечая негативный регулятор TGF- β сигналинга Smad7 для протеасомной деградации (Zhang et al., 2012). Лигаза Rnf12/RLIM инициирует инактивацию импринтированной X-хромосомы, осуществляя убиквитинирование Rex1 и его последующую деградацию (Shin et al., 2010; Gontan et al., 2012).

Высокий уровень экспрессии компонент УПС в ЭСК человека и его снижение во время дифференцировки данных клеток предполагает важную роль УПС в регуляции плюрипотентности (Szutorisz et al., 2006). Анализ транскриптома ЭСК при нокдауне Oct4 выявил значительные изменения в экспрессии более 1000 генов, из которых 18 генов были связаны с УПС (Babaie et al., 2007). Результаты некоторых исследований указывают также на усиленную протеасомную активность в ЭСК, которая характеризуется повышенными уровнями белка субъединицы 19S протеасомы Rpn6 (PSMD11) и соответствующей усиленной сборкой 26S/30S-протеасом (Vilchez et al., 2012). Интересно, что в ЭСК мыши мишенями протеасом являются РНК-полимераза II и факторы транскрипции, связывающиеся с тканеспецифическими регуляторными участками генов, с тем чтобы ограничивать транскрипцию этих генов в ЭСК и способствовать их быстрой активации при дифференцировке (Szutorisz et al., 2006). По результатам анализа транскрипционного профиля ЭСК человека, ген индуцибельной субъединицы протеасомы $\beta 5i$ был выявлен среди наиболее активно экспрессирующихся генов (Sato et al., 2003). В дальнейших исследованиях была обнаружена повышенная экспрессия и других генов УПС в ЭСК по сравнению с дифференцированными клетками, что может говорить о важности участия данной системы в поддержании плюрипотентности (Baharvand et al., 2006; Assou et al., 2009). Ингибирование протеасом вызывает прекращение самообновления и выход из плюрипотентного состояния (Assou et al., 2009; Atkinson et al., 2012; Vilchez et al., 2012). Замечено, что ингибирование протеасом приводило к подавлению экспрессии связанных с плюрипотентностью генов, таких как *POU5F1*, *NANOG*, *C-MYC*, *SOX2*, *SSEA3*, *TRA-1-81* и *TRA-1*, а также к активации генов дифференцировки, таких как *FGF5* и *GATA4*. Интересно, что селективное ингибирование активности иммунопротеасомной субъединицы $\beta 1i$ (UK-101) и $\beta 5i$ (PR-957) в ЭСК человека также сопровождается индукцией экспрессии соматических маркеров, таких как *FGF5* и *GATA4*, что указывает на важность активности иммунопротеасом в поддержании клеточной плюрипотентности (Atkinson et al., 2012).

Транскрипционный фактор Nrf2, известный ключевой ген плюрипотентности, действует как регулятор активности протеасом в ЭСК человека частично через шаперон POMP (Jang et al., 2014). O-GlcNA-цилирование регулятора протеасомы PA28 γ поддерживает плюрипотентность ЭСК мыши посредством контроля гомеостаза Р-телец (Pescori et al., 2021). Эта модификация способствует деградации Ddx6, который важен для сборки Р-телец, и, напротив, потеря O-GlcNA-цилирования PA28 γ стабилизирует Ddx6, повышая уровни Р-телец и приводя к спонтанному выходу ЭСК мыши из плюрипотентного состояния.

В совокупности, существующие в литературе данные подтверждают, что повышенная активность протеасом является неотъемлемой характеристикой идентичности ЭСК. Почему эти клетки нуждаются в усиленной протеасомной активности? Одна из возможностей заключается в том, что ЭСК не могут переносить токсичные, неправильно свернутые белки, имеют повышенные требования к УПС, позволяя этим клеткам поддерживать интактный протеом для самообновления и производства предшественников трех зародышевых листков. Показано, например, что вместе с регуляторной частицей PA28, протеасомный комплекс удаляет большое количество поврежденных окислением белков при дифференцировке ЭСК (Hernebring et al., 2006, 2013). Также, УПС в ПСК активно задействована в регуляции стабильности различных регуляторных белков, особенно тех, которые участвуют в регуляции транскрипции и сигнальных каскадов (Naujokat, Saric, 2007). УПС модулирует судьбу ПСК посредством убиквитинирования/деубиквитинирования и последующей деградацией основных регуляторов плюрипотентности, таких как транскрипционные факторы Oct4, Nanog, c-Myc, Klf4 и Sox2 (Buckley et al., 2012; Hernebring et al., 2013), а также участники сигнальных путей LIF/JAK/STAT3, Nodal/TGF β /Activin, Wnt/ β -catenin, Notch, и BMP (James et al., 2005; Ogawa et al., 2006; Greber et al., 2008; Powers et al., 2009; Hatakeyama, 2012; Tanaka, 2013). Регуляция времени жизни регуляторных белков посредством УПС позволяет этим клеткам быстро реагировать на сигналы, поступающие из внешней среды, сохраняя при этом свои плюрипотентные свойства и способность реализовывать конкретные программы клеточной дифференцировки.

УПС В РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

Изменение уровня экспрессии транскрипционных факторов, особенно Oct4, Nanog, Klf4, Sox2 и c-Myc, является важным регулирующим событием в судьбе ПСК (Lengner et al., 2007; Tolkunova et al., 2007; Xu et al., 2009b; DeVeale et al., 2013; Fang et al., 2014; Liu et al., 2020). Самые не-

значительные изменения в уровне экспрессии данных транскрипционных факторов в ПСК могут приводить к выходу из плюрипотентного состояния, дифференцировке или онкогенезу (Gidekel et al., 2003; Fang et al., 2014; Liu et al., 2020). Исследования показали, что УПС участвует в регуляции сложного процесса клеточного репрограммирования и что как ЭСК, так и иПСК используют УПС сходными способами для регуляции уровней и активности ключевых факторов плюрипотентности (Buckley et al., 2012). Среди этих транскрипционных факторов находятся и четыре транскрипционных фактора Яманаки, Oct4, Sox2, c-Мус, Klf4, которые репрограммируют соматические клетки в иПСК (Takahashi, Yamanaka, 2006).

Oct4 является транскрипционным фактором, имеющим POU-домен (Scholer et al., 1989; Choi, Baek, 2018), и специфично экспрессируется в ЭСК, ранних эмбрионах и в клетках зародышевой линии. Данный транскрипционный фактор играет важную роль в поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК, и является одним из факторов репрограммирования при получении иПСК (Takahashi, Yamanaka, 2006; Liu et al., 2020). Oct4 может образовывать димеры с транскрипции факторами POU-, HMG-box и других семейств (см. обзор (Bakhmet, Tomilin, 2021)). POU-домен необходим для цитоплазматической локализации белка Oct4 в клетке (Oka et al., 2013). Важно отметить, что экспрессия Oct4 необходима для регуляции плюрипотентности и ранней дифференцировки ЭСК, однако, уровень экспрессии Oct4 очень тонко регулируется в ЭСК, так как повышение или понижение может приводить к дифференцировке клеток. Так, показано, что сверхэкспрессия Oct4 индуцирует дифференцировку ЭСК в энтодерму и мезодерму, в то время как подавление экспрессии Oct4 приводит к дифференцировке этих клеток в трофэктодерму (Niwa et al., 2000). Oct4 имеет относительно короткий период полужизни, быстро деградируя в клетке посредством УПС (Li et al., 2018). Убиквитинирование Oct4 осуществляет E3-убиквитин-лигаза Wwp2, несущая карбоксильный конец (HECT), и нокдаун Wwp2 в ЭСК мыши приводил к повышению уровня Oct4 (Xu et al., 2004). При этом было показано, что моноубиквитинирование инактивировало транскрипционную активность Oct4, тогда как полиубиквитинирование (преимущественно по K63) снижало уровень данного транскрипционного фактора в клетке (Liao, Jin, 2010). Другая HECT-лигаза Itch негативно регулирует активность Oct4 в клетке и, таким образом, поддерживает самообновление ЭСК (Liao et al., 2013). Несмотря на то, что Wwp2 и Itch принадлежат к одному семейству HECT-убиквитин-лигаз, они по-разному взаимодействуют с Oct4. Itch нацелен на определенный ДНК-связывающий домен Oct4, а

Wwp2 может взаимодействовать с любым доменом Oct4 (Liao, Jin, 2010; Liao et al., 2013). Также, поддерживать состояние плюрипотентности ЭСК, регулируя уровень Oct4, могут E3-лигазы Rnf2 (RING-убиквитин лигаза) и Dpf2 (PHD-убиквитин-лигаза) (van der Stoep et al., 2008; Liu et al., 2015). При нокдауне Dpf2 повышался уровень Oct4, что приводило к индукции дифференцировки ЭСК человека (Liu et al., 2015). Помимо убиквитин-лигаз, в контроле уровня Oct4 в клетке задействованы DUB ферменты, например, Usp44 и Usp34 (Fuchs et al., 2012; Oh et al., 2017; Rhie et al., 2021). Замечено, что во время дифференцировки наблюдается снижение количества Usp44 и Usp34, что свидетельствует об их специфичности для ЭСК. Дефицит Usp34 приводил к накоплению Oct4, что поддерживало состояние плюрипотентности (Oh et al., 2017). Однако, отсутствие Usp44, напротив, вызывало снижение уровня Oct4 при дифференцировке ЭСК (Fuchs et al., 2012).

Sox2 (SRY box-containing gene 2) – транскрипционный фактор из семейства Sox, который экспрессируется в клетках половой линии, на ранних стадиях эмбриогенеза и в нейрональных стволовых клетках (НСК), а также является ключевым фактором при получении иПСК (Koopman et al., 2004; Liu et al., 2020). Sox2 содержит HMG-бок (High Mobility Group-box), который взаимодействует с АТ-богатыми мотивами ДНК цепи и индуцирует активацию транскрипции на данном участке. HMG-домен имеет несколько участков, связанных с трансактивационной активностью на С-конце. Sox2 необходим для регуляции факторов транскрипции, которые влияют на экспрессию Oct4, и считается, что работа транскрипционного фактора Sox2 важна для сохранения плюрипотентного состояния ЭСК за счет поддержания необходимого уровня экспрессии Oct4 (Masui et al., 2007). Интересно, что как подавление экспрессии Sox2, так и его повышенная экспрессия, вызывали снижение экспрессии Oct4 и Nanog, что приводило к активации трофэктодермальных генов и к трофэктодермальной дифференцировке ЭСК человека (Adachi et al., 2010). Замечено также, что повышенная экспрессия Sox2 в ЭСК и иПСК снижает экспрессию мезодермальных генов и индуцирует дифференцировку в нейроэктодермальные, мезодермальные и трофэктодермальные клетки (Suresh et al., 2016). Таким образом, как и в случае с Oct4, для определения судьбы ЭСК важен определенный уровень Sox2 (Strebinger et al., 2019). Уровень белка Sox2 регулируется в ЭСК посредством УПС, причем оказалось, что фосфорилирование Sox2 усиливает способность ЭСК мыши к самообновлению за счет стабилизации Sox2, предотвращая его убиквитин-зависимую деградацию (Ouyang et al., 2015). Ингибирование киназы Akt1, для которой показана способность фосфорилировать Sox2,

вызывало снижение уровня Sox2 в клетке и подавляло способность ЭСК мыши к самообновлению (Jeong et al., 2010). E3-лигаза Ubr5 индуцирует деградацию Sox2 посредством его убиквитинирования, а фосфорилирование Sox2 с помощью Akt ингибирует взаимодействие Ubr5 с Sox2, что стабилизирует Sox2 (Wang et al., 2019). Последующее исследование показало сложную регуляцию уровня Sox2 в ЭСК, в основе которой лежит сбалансированное переключение между метилированием и фосфорилированием этого белка (Fang et al., 2014). Метилтрансфераза Set7 монометирует Sox2 по K119, что ведет к его убиквитинированию E3-лигазой Wwp2 и к последующей протеасомной деградации. Напротив, киназа Akt1 фосфорилирует Sox2 по T118, что приводит к стабилизации Sox2, предотвращая его метилирование с помощью Set7 (Fang et al., 2014). В стабилизации Sox2 также задействованы деметилаза Lsd1 и белок Phf2011, а их нокдаун ухудшает самообновление ЭСК мыши (Zhang et al., 2018). С метилированным Sox2 также связывается белок L3mbtl3, что приводит к рекрутированию другой лигазы Crl4-Dcaf5 и убиквитин-зависимому протеолизу Sox2 (Zhang et al., 2019). Sox2 является также мишенью для DUB фермента Usp22 (Sussman et al., 2013). Помимо Usp22, DUB ферментами для Sox2 могут являться Usp7 (Cox et al., 2013; Huang et al., 2021), Usp9x (Oishi et al., 2016; Chen et al., 2020; Potu et al., 2021), Usp15, Usp24 (Wuebben, Rizzino, 2017), Usp25, Usp37 (Qiu et al., 2017), Usp34 (Oh et al., 2017), Usp44 и Usp49 (Boyer et al., 2005). Идентифицирован еще один RING-лигазный комплекс Cul4a-Det1-Cop1 и DUB фермент Otud7b, которые регулируют стабильность белка Sox2 во время дифференцировки нервных клеток-предшественников (Cui et al., 2018). Так, нокдаун Cop1 стабилизировал Sox2, предотвращая дифференцировку этих клеток, тогда как нокдаун Otud7b, напротив, дестабилизировал Sox, запуская дифференцировку.

Klf4 (Krüppel-like factor 4, также имеет название GSKLF (Gut-enriched Krüppel-like factor)) – это цинк-фингерный транскрипционный фактор подсемейства Klf, которое относится к большому семейству транскрипционных факторов Sp1 (Kaczynski et al., 2003). Klf4 вовлечен в контроль таких биологических процессов как пролиферация, клеточная дифференцировка и апоптоз (Jiang et al., 2008). Помимо этого, Klf4 используют как один из факторов репрограммирования в ходе получения iPСК. Интересно, что в отличие от Oct4 и Sox2, Klf4 очень стабилен в ЭСК (период полужизни более 24 ч), однако, эта высокая стабильность заметно снижается при дифференцировке (Dhaliwal et al., 2019). Высокая стабильность Klf4 в ЭСК поддерживается за счет взаимодействия с факторами Nanog, Sox2 и Stat3. Пост-трансляционная модификация (убиквитинирование) Klf4 деста-

билизирует белок, когда клетки выходят из плюрипотентного состояния, что указывает на роль пост-трансляционных механизмов в поддержании стабильности белка и плюрипотентного состояния. Обнаружено, что снижение уровня белка Klf4 связано с функцией протеасом (Chen et al., 2005). Erk1/2-опосредованное фосфорилирование по Ser123 подавляет активность Klf4, вызывая дифференцировку ЭСК (Kim et al., 2012). Это фосфорилирование является меткой для узнавания Klf4 E3-лигазы Scf-Trcp и последующей протеасомной деградации, что впоследствии и приводит к дифференцировке ЭСК. С другой стороны, Klf4 транскрипционно активирует экспрессию E3-лигазы RING-типа March5, которая регулирует плюрипотентность, старение, генерацию активных форм кислорода (АФК) и деление митохондрий (Shiiba et al., 2020). В ЭСК мыши March5 действует как незаменимый фактор для поддержания плюрипотентности, полиубиквитинирует PRKARIA при активации PKA, что в конечном итоге приводит к ингибированию сигнального пути Raf/MEK/ERK (Gu et al., 2015). Интересно, что фосфорилирование Klf4 с помощью другой киназы Plk1 вызывало рекрутирование E3-лигазы Traf6, что приводило к убиквитинированию Klf4 и его стабилизации в раковых клетках (Mai et al., 2019). Полногеномный скрининг E3-лигаз также определил еще одну лигазу Scf-Fbxo32, которая отвечает за убиквитинирование и деградацию Klf4 (Zhou et al., 2017).

c-Myc – транскрипционный фактор из семейства Myc, регулирующий многие клеточные процессы, включая пролиферацию, апоптоз, дифференцировку и онкогенез (Dang, 2013). Важно, что c-Myc поддерживает плюрипотентность ЭСК мыши и также является фактором репрограммирования при генерации iPСК (Schmidt, Plath, 2012; Takahashi, Yamanaka, 2016). Сверхэкспрессия c-Myc поддерживает плюрипотентное состояние ЭСК мыши, в то время как подавление активности c-Myc вызывает дифференцировку этих клеток (Cartwright et al., 2005). В случае ЭСК человека, активация c-Myc не поддерживала плюрипотентность, а, напротив, приводила к дифференцировке и апоптозу этих клеток (Sumi et al., 2007). c-Myc функционирует совместно с Oct4, Sox2 и Klf4, избирательно повышая эффективность транскрипции генов, специфичных для ЭСК; также он увеличивает эффективность образования iPСК (Nakagawa et al., 2008). Убиквитинирование и протеолиз важны для регуляции стабильности и правильного функционирования c-Myc. Известно, что c-Myc обладает малым периодом полужизни, что обеспечивается УПС (Fargell, Sears, 2014). В структуре c-Myc выделяют два домена гомологии MBI и MBII, для которых показана связь с убиквитинированием и протеолизом c-Myc (Flinn et al., 1998). Кроме того, за убиквити-

нирование с-Мус также отвечает N-концевая часть данного белка (Salghetti et al., 1999). Помимо этого, с-Мус имеет PEST-мотив, который также играет роль в быстрой деградации с-Мус, но не в его убиквитинировании (Gregory, Hann, 2000). Убиквитинирование с-Мус в клетке осуществляют несколько E3-убиквитин-лигаз, первой из которых была идентифицирована Skp2 (Kim et al., 2003). Оказалось, что Skp2 убиквитинирует с-Мус в разных доменах, являясь транскрипционным кофактором для с-Мус (von der Lehr et al., 2003). E3-убиквитин-лигаза Fbw7 также убиквитинирует с-Мус и способствует его протеасомной деградации (Welcker et al., 2004). Важно отметить, что на уровень белка с-Мус влияют два последовательных и взаимозависимых пролин-направленных фосфорилирования S62 и T58, при этом фосфорилирование в каждом из этих двух сайтов влияет на взаимодействие с-Мус с изомеразой Pin1 и его изомеризацию в положении P63 (Farrell et al., 2013; Helander et al., 2015). Иницирующее фосфорилирование S62 с помощью киназ MAPK, c-JUN или CDK1 задействует с-Мус для последующего фосфорилирования T58 с помощью киназы GSK3 (Gregory et al., 2003). Фосфорилирование T58 приводит к удалению активирующего фосфата S62 за счет действия пролин-направленной транс-специфической фосфатазы PP2A-B56 α (Arnold, Sears, 2006), что способствует дальнейшему полиубиквитинированию с помощью убиквитин-лигазы Fbw7 и протеасомной деградации с-Мус (Welcker et al., 2004). Показано, что STAT3-зависимая регуляция транскрипции с-Мус и подавление его фосфорилирования T58 имеют решающее значение для регуляции его активности в ЭСК мыши, и, следовательно, для поддержания самообновления ЭСК (Cartwright et al., 2005). Интересно, что лигаза Rnf12/RLIM полиубиквитинирует с-Мус независимо от фосфорилирования по S62 и T58, однако это убиквитинирование не влияет на стабильность с-Мус, но подавляет транскрипционную активность с-Мус (Gao et al., 2016). Также были выявлены DUB-ферменты, взаимодействующие с с-Мус – Usp13, Usp22, Usp28, Usp36 и Usp37. DUB Usp13 стабилизирует с-Мус посредством антагонизма с Fbx14-опосредованным убиквитинированием, что важно для самообновления стволовых клеток глиомы (Fang et al., 2017). Другая DUB, Usp22, также способствует деубиквитинизации с-Мус, что приводит к увеличению уровня с-Мус в нескольких линиях раковых клеток (Kim et al., 2017). В регуляции активности с-Мус обнаружена петля обратной связи с-Мус–Sirt1, поскольку с-Мус индуцирует экспрессию Sirt1, который в свою очередь деацетилирует с-Мус, понижая стабильность с-Мус (Yuan et al., 2009). Однако, сверхэкспрессия Sirt1 также связана с с-Мус-индуцированной экспрессией Usp22, а это приводит к снижению убикви-

тинирования Sirt1 и повышению стабильности последнего (Li et al., 2014a). Предполагалось, что DUB Usp28 не может взаимодействовать с с-Мус напрямую, но может регулировать данный белок через взаимодействие с Fbw7 (Popov et al., 2007). Однако, другое исследование показало, что Usp28 не зависит от присутствия Fbw7, при этом распознает и деубиквитинирует те же субстраты, что и лигаза Fbw7. Взаимодействие Fbw7 с с-Мус происходит через связывание с фосфорилированным мотивом, так называемым фосфодегроном (Welcker et al., 2004). Usp28 также взаимодействует с этим же мотивом, но только когда он не фосфорилирован (Diefenbacher et al., 2015). Usp36 и Usp37 деубиквитинируют и стабилизируют с-Мус в ядре клетки; при подавлении активности Usp36 и Usp37 повышается протеасомная деградация с-Мус, и пролиферация ЭСК значительно снижается (Pan et al., 2015; Sun et al., 2015).

Важно отметить, что репрограммирование соматических клеток с помощью транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус индуцирует окислительный стресс и значительно повышает уровни АФК как *in vitro* (Banito et al., 2009), так и *in vivo* (Mosteiro et al., 2018). Высокий уровень АФК приводит к повреждению клеток, старению и апоптозу, в то время как добавление антиоксидантов, таких как N-ацетилцистеин или витамин С, предотвращает вызванное АФК повреждение и ПСК (Zhou et al., 2016; Cieřlar-Pobuda et al., 2017; Lee et al., 2018). Как чрезмерная продукция АФК, так и снижение уровня АФК антиоксидантами на раннем этапе репрограммирования снижают эффективность получения и ПСК (Zhou et al., 2016). Помимо этого, показано повышение уровня синтеза антиоксидантов в клетке на поздней стадии репрограммирования (Zhou et al., 2016). Также, было продемонстрировано, что для эффективного получения и ПСК необходима активация врожденного иммунитета (Lee et al., 2012). В ходе соматического репрограммирования индуцируются NF- κ B- и IRF3-опосредованные изменения в экспрессии эпигенетических модификаторов, которые обеспечивают открытое состояние хроматина (Lee et al., 2012). Исследования показывают, что повышение АФК-сигналинга активирует процессы врожденного иммунитета в соматических клетках (Nathan, Cunningham-Bussel, 2013; Panday et al., 2015).

Замечено, что ингибирование активности протеасом, как и иммунопротеасом, значительно снижало эффективность генерации и ПСК (Atkinson et al., 2012; Buckley et al., 2012), что происходило несмотря на усиление экспрессии генов Oct4 и Nanog (Floyd et al., 2015). Одной из функций УПС является деградация поврежденных, в том числе, окисленных белков (Margulis et al., 2020). Показано, что в условиях окислительного стресса, протеолитической активности АТФ-зависимой 26S-

протеасомы недостаточно для деградации быстро образующихся поврежденных белков (Seifert et al., 2010). Во время дифференцировки в условиях окислительного стресса количество 26S-протеасом практически не изменяется, тогда как резко повышается уровень иммунопротеасом и регуляторной частицы PA28 α/β (Hernebring et al., 2013). Предполагают, что АТФ-независимый комплекс иммунопротеасомы с двумя регуляторными частицами PA28, а также АТФ-зависимая гибридная протеасома, состоящая из иммунопротеасомы и регуляторов 19S и PA28, ответственны, преимущественно, за снижение количества окислительно-модифицированных белков в процессе окислительного стресса (Hernebring et al., 2006, 2013). По сравнению с конститутивными субъединицами, индуцибельные субъединицы протеасом обладают более быстрым ответом и протеолитической активностью, что повышает эффективность деградации окисленных белков (Seifert et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

УПС регулирует протеолиз, осуществляя мониторинг стабильности и активности белка в клетке, и, следовательно, функционирует во всех белок-зависимых клеточных процессах, включая регуляцию клеточного цикла, транскрипции и трансляции, и работу ключевых сигнальных путей. Кроме того, известно, что УПС участвует в деградации поврежденных белков и большей части окисленных белков, обеспечивая усиленную защиту клеток от последствий окислительного и других стрессов. ЭСК, как и iPSC, характеризуются уникальными транскриптомными, эпигеномными и протеомными сигнатурами, которые организованы высокоточной регуляторной сетью, а также обладают повышенной активностью защитных систем клетки. Учитывая это, неудивительно, что в ЭСК сильно активированы гены, ассоциированные с УПС (Ramalho-Santos et al., 2002). Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных, становится очевидно, что УПС играет важнейшую роль в становлении и поддержании плюрипотентности и в выборе направления специализации ПСК как через модуляцию экспрессии, активности и субстратной специфичности протеасомных комплексов, так и посредством перекрестной регуляции основных транскрипционных факторов плюрипотентности и участников регуляторной сети с помощью E1-E2-E3 и DUB-ферментов УПС. Каждый год идентифицируют все новые E3-убиквитин-лигазы и ферменты DUB, связанные с поддержанием плюрипотентности ЭСК и их дифференцировкой. Совместная работа эти компонентов УПС в ПСК обеспечивает баланс между убиквитинированием и деубиквитинированием основных регуляторов плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 и других ключевых

факторов и, тем самым, определяет судьбу этих клеток. Так, например, E3-лигазы катализируют убиквитинирование белков, связанных со “стволовостью”, а также их последующую деградацию в протеасомах, что приводит к выходу ЭСК из состояния плюрипотентности посредством дифференцировки. Напротив, когда ассоциированные с плюрипотентностью белки деубиквитинируются DUB, дифференцировка ЭСК ингибируется. Возможность получения iPSC из соматических клеток в процессе репрограммирования также поставила вопрос о роли УПС в индукции клеточной плюрипотентности. Как уже упоминалось, репрессирующие факторы Oct4, Klf4, Sox2, и c-Myc убиквитинируются и подвергаются протеолизу в протеасомах. С другой стороны, ингибирование протеасомной активности вызывает сильное снижение эффективности репрограммирования (Atkinson et al., 2012; Buckley et al., 2012; Floyd et al., 2015). Интересно, что селективное ингибирование активности иммунопротеасомы также приводит к снижению клонообразования в процессе репрограммирования (Atkinson et al., 2012), однако, функциональное значение иммунопротеасомы в становлении плюрипотентности остается неисследованным.

Несмотря на бурное развитие данной темы, всестороннее понимание роли УПС в регуляции плюрипотентности, дифференцировки и репрограммирования невозможно без ответов на такие вопросы, например, как УПС динамически регулирует разные этапы репрограммирования. Как координируется работа различных E3-лигаз в отношении своих мишеней – факторов плюрипотентности и других регуляторов – в равновесных состояниях ЭСК/iPSC и в процессах репрограммирования и дифференцировки? Более того, крайне фрагментарно понимание того как убиквитинирование сопряжено с другими пост-трансляционными модификациями белков, такими как метилирование, ацетилирование и фосфорилирование, в контексте организации молекулярных сигнатур плюрипотентности. Ответы на эти и другие вопросы позволят в будущем лучше понять биологию ПСК, а следовательно, приблизят их дальнейшее применение в клинической практике.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-29-04117).

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. Зубарев и У.И. Поденкова написали основную часть текста и подбирали литературу. И.В. Зубарев делал иллюстрации. А.С. Цимоха подбирала литературу, написала введение и заключение. А.Н. Томилин и А.С. Цимоха редактировали текст и вносили заключительные правки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y. et al.* Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells // *Genes to Cells*. 2010. V. 15. № 5. P. 455–470.
- Amariglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W. et al.* Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient // *PLoS Medicine*. 2009. V. 6. № 2. P. e1000029.
- Arnold H.K., Sears R.C.* Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 α associates with c-Myc and negatively regulates c-Myc accumulation // *Mol. and Cellular Biol.* 2006. V. 26. № 7. P. 2832–2844.
- Assou S., Cerecedo D., Tondeur S. et al.* A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 10.
- Atkinson S.P., Collin J., Irina N. et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 7. P. 1373–1384.
- Babaie Y., Herwig R., Greber B. et al.* Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 2. P. 500–510.
- Bader M., Benjamin S., Wapinski O.L. et al.* A conserved F box regulatory complex controls proteasome activity in *Drosophila* // *Cell*. 2011. V. 145. № 3. P. 371–382.
- Baharvand H., Hajheidari M., Ashiani S.K. et al.* Proteomic signature of human embryonic stem cells // *Proteomics*. 2006. V. 6. № 12. P. 3544–3549.
- Bakhmet E.I., Tomilin A.N.* Key features of the POU transcription factor Oct4 from an evolutionary perspective // *Cellular and Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. № 23. P. 7339–7353.
- Banito A., Rashid S.T., Acosta J.C. et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells // *Genes & Development*. 2009. V. 23. № 18. P. 2134–2139.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // *Cell*. 2005. V. 122. № 6. P. 947–956.
- Brennand K.J., Simone A., Jou J. et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2011. V. 473. № 7346. P. 221–225.
- Briggs J.A., Sun J., Shepherd J. et al.* Integration-free induced pluripotent stem cells model genetic and neural developmental features of down syndrome etiology // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 467–478.
- Buckley S.M., Aranda-Orgilles B., Strikoudis A. et al.* Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. № 6. P. 783–798.
- Cartwright P., McLean C., Sheppard A. et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism // *Development*. 2005. V. 132. № 5. P. 885–896.
- Chen X., Zhang X., Cai H. et al.* Targeting USP9x/SOX2 axis contributes to the anti-osteosarcoma effect of neogamibogic acid // *Cancer Letters*. 2020. V. 469. P. 277–286.
- Chen Z.Y., Wang X., Zhou Y. et al.* Destabilization of Kruppel-like factor 4 protein in response to serum stimulation involves the ubiquitin-proteasome pathway // *Cancer Research*. 2005. V. 65. № 22. P. 10394–10400.
- Cho-Park P.F., Steller H.* Proteasome regulation by ADP-ribosylation // *Cell*. 2013. V. 153. № 3. P. 614–627.
- Choi J., Baek K.H.* Cellular functions of stem cell factors mediated by the ubiquitin-proteasome system // *Cellular and Mol. Life Sci.: CMLS*. 2018. V. 75. № 11. P. 1947–1957.
- Chondrogianni N., Gonos E.S.* Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012. V. 109. P. 41–74.
- Cieřlar-Pobuda A., Yue J., Lee H.-C. et al.* ROS and oxidative stress in stem cells. *Hindawi*, 2017.
- Cox J.L., Wilder P.J., Gilmore J.M. et al.* The SOX2-interactome in brain cancer cells identifies the requirement of MSI2 and USP9X for the growth of brain tumor cells // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. e62857.
- Cui C.-P., Zhang Y., Wang C. et al.* Dynamic ubiquitylation of Sox2 regulates proteostasis and governs neural progenitor cell differentiation // *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 1–15.
- Dang C.V.* MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013. V. 3. № 8. P. a014217.
- Delevoe C., Marks M.S., Raposo G.* Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system // *Current Opinion in Cell Biol.* 2019. V. 59. P. 147–158.
- DeRosa B.A., Van Baaren J.M., Dubey G.K. et al.* Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells // *Neuroscience Letters*. 2012. V. 516. № 1. P. 9–14.
- Deuse T., Hu X., Gravina A. et al.* Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients // *Nature Biotechnol.* 2019. V. 37. № 3. P. 252–258.
- De Veale B., Brokhman I., Mohseni P. et al.* Oct4 is required ~E7. 5 for proliferation in the primitive streak // *PLoS Genetics*. 2013. V. 9. № 11. P. e1003957.
- Dhaliwal N.K., Abatti L.E., Mitchell J.A.* KLF4 protein stability regulated by interaction with pluripotency transcription factors overrides transcriptional control // *Genes & Development*. 2019. V. 33. № 15–16. P. 1069–1082.
- Diefenbacher M.E., Chakraborty A., Blake S.M. et al.* Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer // *Cancer Research*. 2015. V. 75. № 7. P. 1181–1186.

- Dikic I., Robertson M.* Ubiquitin Ligases and Beyond Springer, 2012.
- Doss M.X., Sachinidis A.* Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications // *Cells*. 2019. V. 8. № 5. P. 403.
- Fang L., Zhang L., Wei W. et al.* A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation // *Molecular Cell*. 2014. V. 55. № 4. P. 537–551.
- Fang X., Zhou W., Wu Q. et al.* Deubiquitinase USP13 maintains glioblastoma stem cells by antagonizing FBXL14-mediated Myc ubiquitination // *J. Experimental Medicine*. 2017. V. 214. № 1. P. 245–267.
- Farrell A.S., Pelz C., Wang X. et al.* Pin1 regulates the dynamics of c-Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis // *Molecular and Cellular Biol.* 2013. V. 33. № 15. P. 2930–2949.
- Farrell A.S., Sears R.C.* MYC degradation // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014. V. 4. № 3.
- Flinn E.M., Busch C.M., Wright A.P.* myc boxes, which are conserved in myc family proteins, are signals for protein degradation via the proteasome // *Mol. and Cellular Biol.* 1998. V. 18. № 10. P. 5961–5969.
- Floyd Z.E., Staszkievicz J., Power R.A. et al.* Prolonged proteasome inhibition cyclically upregulates Oct3/4 and Nanog gene expression, but reduces induced pluripotent stem cell colony formation // *Cellular Reprogramming*. 2015. V. 17. № 2. P. 95–105.
- Fuchs G., Shema E., Vesterman R. et al.* RNF20 and USP44 regulate stem cell differentiation by modulating H2B monoubiquitylation // *Molecular Cell*. 2012. V. 46. № 5. P. 662–673.
- Gao J., Buckley S.M., Cimmino L. et al.* The CUL4-DDB1 ubiquitin ligase complex controls adult and embryonic stem cell differentiation and homeostasis // *eLife*. 2015. V. 4. P. e07539.
- Gao R., Wang L., Cai H. et al.* E3 ubiquitin ligase RLIM negatively regulates c-Myc transcriptional activity and restrains cell proliferation // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. P. e0164086.
- Gidekel S., Pizov G., Bergman Y. et al.* Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant // *Cancer Cell*. 2003. V. 4. № 5. P. 361–370.
- Glickman M.H., Ciechanover A.* The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction // *Physiological Reviews*. 2002. V. 82. № 2. P. 373–428.
- Gontan C., Achame E.M., Demmers J. et al.* RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation // *Nature*. 2012. V. 485. № 7398. P. 386–390.
- Gorbea C., Goellner G.M., Teter K. et al.* Characterization of mammalian Ecm29, a 26 S proteasome-associated protein that localizes to the nucleus and membrane vesicles // *The J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 52. P. 54849–54861.
- Greber B., Lehrach H., Adjaye J.* Control of early fate decisions in human ES cells by distinct states of TGF β pathway activity // *Stem Cells and Development*. 2008. V. 17. № 6. P. 1065–1078.
- Gregory M.A., Hann S.R.* c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells // *Mol. and Cellular Biol.* 2000. V. 20. № 7. P. 2423–2435.
- Gregory M.A., Qi Y., Hann S.R.* Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 51. P. 51606–51612.
- Gu H., Li Q., Huang S. et al.* Mitochondrial E3 ligase March5 maintains stemness of mouse ES cells via suppression of ERK signalling // *Nature Communications*. 2015. V. 6. № 1. P. 1–12.
- Gurdon J.B.* The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // *Journal of Embryology and Experimental Morphology* published for the company of biologists limited Oxford: at the clarendon press, 1962.
- Hatakeyama S.* Ubiquitin-mediated regulation of JAK-STAT signaling in embryonic stem cells // *Jak-Stat*. 2012. V. 1. № 3. P. 168–175.
- Helander S., Montecchio M., Pilstål R. et al.* Pre-anchoring of Pin1 to unphosphorylated c-Myc in a fuzzy complex regulates c-Myc activity // *Structure*. 2015. V. 23. № 12. P. 2267–2279.
- Hernebring M., Brolen G., Aguilaniu H. et al.* Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. V. 103. № 20. P. 7700–7705.
- Hernebring M., Fredriksson A., Liljevald M. et al.* Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28 // *Scientific Reports*. 2013. V. 3. P. 1381.
- Huang Z., Zhai K., Wu Q. et al.* HAUSP Stabilizes SOX2 through deubiquitination to maintain self-renewal and tumorigenic potential of glioma stem cells // *bioRxiv*. 2021.
- Huber E.M., Groll M.* The mammalian proteasome activator PA28 forms an asymmetric $\alpha 4\beta 3$ complex // *Structure*. 2017. V. 25. № 10. P. 1473–1480. e1473.
- James D., Levine A.J., Besser D. et al.* TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Development*. 2005. V. 132(6). P. 1273–1282. <http://doi.org/10.1242/dev.01706>. 2005
- Jang J., Wang Y., Kim H.S. et al.* Nrf2, a regulator of the proteasome, controls self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2014. V. 32. № 10. P. 2616–2625.
- Jeong C.H., Cho Y.Y., Kim M.O. et al.* Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 12. P. 2141–2150.
- Jiang J., Chan Y.S., Loh Y.H. et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells // *Nature Cell Biol.* 2008. V. 10. № 3. P. 353–360.
- Jin J., Liu J., Chen C. et al.* The deubiquitinase USP21 maintains the stemness of mouse embryonic stem cells via stabilization of Nanog // *Nature Communications*. 2016. V. 7. № 1. P. 1–15.
- Jung T., Grune T.* Structure of the proteasome // *Progress in Mol. Biol. and Translational Sci.* 2012. V. 109. P. 1–39.
- Kaczynski J., Cook T., Urrutia R.* Sp1- and Kruppel-like transcription factors // *Genome Biol.* 2003. V. 4. № 2. P. 206.
- Khor B., Bredemeyer A.L., Huang C.Y. et al.* Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis //

- Molecular and Cellular Biol. 2006. V. 26. № 8. P. 2999–3007.
- Kim D., Hong A., Park H.I. et al. Deubiquitinating enzyme USP22 positively regulates c-Myc stability and tumorigenic activity in mammalian and breast cancer cells // J. Cellular Physiology. 2017. V. 232. № 12. P. 3664–3676.
- Kim M.O., Kim S.-H., Cho Y.-Y. et al. ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4 // Nature Structural & Mol. Biol. 2012. V. 19. № 3. P. 283–290.
- Kim S.Y., Herbst A., Tworkowski K.A. et al. Skp2 regulates Myc protein stability and activity // Molecular Cell. 2003. V. 11. № 5. P. 1177–1188.
- Kniepert A., Groettrup M. The unique functions of tissue-specific proteasomes // Trends in Biochemical Sciences. 2014. V. 39. № 1. P. 17–24.
- Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G. Role of proteasomes in cellular regulation // International Review of Cell and Mol. Biol. 2008. V. 267. P. 59–124.
- Koopman P., Schepers G., Brenner S. et al. Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in Fugu rubripes // Gene. 2004. V. 328. P. 177–186.
- Kwon S.-K., Lee D.-H., Kim S.-Y. et al. Ubiquitin-specific protease 21 regulating the K48-linked polyubiquitination of NANOG // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017. V. 482. № 4. P. 1443–1448.
- Lee A.S., Tang C., Rao M.S. et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies // Nature Medicine. 2013. V. 19. № 8. P. 998–1004.
- Lee J., Cho Y.S., Jung H. et al. Pharmacological regulation of oxidative stress in stem cells // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018. V. 2018.
- Lee J., Sayed N., Hunter A. et al. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming // Cell. 2012. V. 151. № 3. P. 547–558.
- Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 403–415.
- Li L., Osdal T., Ho Y. et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells // Cell Stem Cell. 2014a. V. 15. № 4. P. 431–446.
- Li S., Xiao F., Zhang J. et al. Disruption of OCT4 ubiquitination increases oct4 protein stability and ASH2L-B-mediated H3K4 methylation promoting pluripotency acquisition // Stem Cell Reports. 2018. V. 11. № 4. P. 973–987.
- Li W., Wang X., Fan W. et al. Modeling abnormal early development with induced pluripotent stem cells from aneuploid syndromes // Human Mol. Genetics. 2012. V. 21. № 1. P. 32–45.
- Li X., Thompson D., Kumar B. et al. Molecular and cellular roles of PI31 (PSMF1) protein in regulation of proteasome function // The J. Biol. Chem. 2014b. V. 289. № 25. P. 17392–17405.
- Liao B., Jin Y. Wwp2 mediates Oct4 ubiquitination and its own auto-ubiquitination in a dosage-dependent manner // Cell Research. 2010. V. 20. № 3. P. 332–344.
- Liao B., Zhong X., Xu H. et al. Itch, an E3 ligase of Oct4, is required for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency induction // J. Cellular Physiology. 2013. V. 228. № 7. P. 1443–1451.
- Lin Z., Yang H., Kong Q. et al. USP22 antagonizes p53 transcriptional activation by deubiquitinating Sirt1 to suppress cell apoptosis and is required for mouse embryonic development // Molecular Cell. 2012. V. 46. № 4. P. 484–494.
- Liu C., Zhang D., Shen Y. et al. DPF2 regulates OCT4 protein level and nuclear distribution // Biochimica et Biophysica Acta. 2015. V. 1853. № 12. P. 3279–3293.
- Liu K., Cao J., Shi X. et al. Cellular metabolism and homeostasis in pluripotency regulation // Protein & Cell. 2020. V. 11. № 9. P. 630–640.
- Liu K., Jones S., Minis A. et al. PI31 is an adaptor protein for proteasome transport in axons and required for synaptic development // Developmental Cell. 2019. V. 50. № 4. P. 509–524. e510.
- Loh Y.-H., Agarwal S., Park I.-H. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood // Blood, The J. American Society of Hematology. 2009. V. 113. № 22. P. 5476–5479.
- Ma D., Wei H., Lu J. et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // European Heart J. 2013. V. 34. № 15. P. 1122–1133.
- Mai J., Zhong Z.-Y., Guo G.-F. et al. Polo-Like Kinase 1 phosphorylates and stabilizes KLF4 to promote tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma // Theranostics. 2019. V. 9. № 12. P. 3541.
- Margulis B., Tsimokha A., Zubova S. et al. Molecular chaperones and proteolytic machineries regulate protein homeostasis in aging cells // Cells. 2020. V. 9. № 5. P. 1308.
- Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells // Nature Cell Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 625–635.
- McCutchen-Maloney S.L., Matsuda K., Shimbara N. et al. cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome // The J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 24. P. 18557–18565.
- Merkle F.T., Ghosh S., Kamitaki N. et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations // Nature. 2017. V. 545. № 7653. P. 229–233.
- Miller D.M., Thomas S.D., Islam A. et al. c-Myc and cancer metabolism (AACR) // Clin. Cancer Res. 2012. V. 18. № 20. P. 5546–53.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- Miyazaki K., Dyson M.T., Furukawa Y. et al. Generation of progesterone-responsive endometrial stromal fibroblasts from human induced pluripotent stem cells: role of the WNT/CTNNB1 pathway // Stem Cell Reports. 2018. V. 11. № 5. P. 1136–1155.
- Moretti A., Bellin M., Welling A. et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome // New England J. Medicine. 2010. V. 363. № 15. P. 1397–1409.

- Mosteiro L., Pantoja C., de Martino A. et al.* Senescence promotes *in vivo* reprogramming through p16 INK 4a and IL-6 // *Aging Cell*. 2018. V. 17. № 2. P. e12711.
- Murata S., Sasaki K., Kishimoto T. et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes // *Science*. 2007. V. 316. № 5829. P. 1349–1353.
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nature Biotechnology*. 2008. V. 26. № 1. P. 101–106.
- Nathan C., Cunningham-Bussel A.* Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species // *Nature Reviews Immunology*. 2013. V. 13. № 5. P. 349–361.
- Naujokat C., Saric T.* Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 10. P. 2408–2418.
- Niwa H., Miyazaki J.-I., Smith A.G.* Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // *Nature Genetics*. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
- Noormohammadi A., Calculli G., Gutierrez-Garcia R. et al.* Mechanisms of protein homeostasis (proteostasis) maintain stem cell identity in mammalian pluripotent stem cells // *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2018. V. 75. № 2. P. 275–290.
- Ogawa K., Nishinakamura R., Iwamatsu Y. et al.* Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. V. 343. № 1. P. 159–166.
- Oh E., Kim J.Y., Sung D. et al.* Inhibition of ubiquitin-specific protease 34 (USP34) induces epithelial-mesenchymal transition and promotes stemness in mammary epithelial cells // *Cellular Signalling*. 2017. V. 36. P. 230–239.
- Oishi S., Premarathne S., Harvey T.J. et al.* Usp9x-deficiency disrupts the morphological development of the postnatal hippocampal dentate gyrus // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 1–13.
- Oka M., Moriyama T., Asally M. et al.* Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells // *J. Biol. Chem*. 2013. V. 288. № 21. P. 15085–15097.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.* Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2007. V. 448. № 7151. P. 313–317.
- Okita Y., Nakayama K.I.* UPS delivers pluripotency // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 11. № 6. P. 728–730.
- Ortega J., Heymann J.B., Kajava A.V. et al.* The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator // *J. Mol. Biol*. 2005. V. 346. № 5. P. 1221–1227.
- Osafune K., Caron L., Borowiak M. et al.* Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines // *Nature Biotechnology*. 2008. V. 26. № 3. P. 313–315.
- Ouyang J., Yu W., Liu J. et al.* Cyclin-dependent kinase-mediated Sox2 phosphorylation enhances the ability of Sox2 to establish the pluripotent state // *The J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. № 37. P. 22782–22794.
- Pan J., Deng Q., Jiang C. et al.* USP37 directly deubiquitinates and stabilizes c-Myc in lung cancer // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 30. P. 3957–3967.
- Panday A., Sahoo M.K., Osorio D. et al.* NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies // *Cellular & Mol. Immunology*. 2015. V. 12. № 1. P. 5–23.
- Pecori F., Kondo N., Ogura C. et al.* Site-specific O-GlcNAcylation of Psme3 maintains mouse stem cell pluripotency by impairing P-body homeostasis // *Cell Reports*. 2021. V. 36. № 2. P. 109361.
- Pickering A.M., Davies K.J.* Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alpha, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012. V. 523. № 2. P. 181–190.
- Popov N., Wanzel M., Madiredjo M. et al.* The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability // *Nature cell biology*. 2007. V. 9. № 7. P. 765–774.
- Potu H., Kandarpa M., Peterson L.F. et al.* Downregulation of SOX2 by inhibition of Usp9X induces apoptosis in melanoma // *Oncotarget*. 2021. V. 12. № 3. P. 160.
- Powers E.T., Morimoto R.I., Dillin A. et al.* Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency // *Annual Review of Biochemistry*. 2009. V. 78. P. 959–991.
- Qian M.X., Pang Y., Liu C.H. et al.* Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis // *Cell*. 2013. V. 153. № 5. P. 1012–1024.
- Qiu G.-Z., Sun W., Jin M.-Z. et al.* The bad seed gardener: Deubiquitinases in the cancer stem-cell signaling network and therapeutic resistance // *Pharmacology & Therapeutics*. 2017. V. 172. P. 127–138.
- Ramakrishna S., Kim K.-S., Baek K.-H.* Posttranslational modifications of defined embryonic reprogramming transcription factors // *Cellular Reprogramming*. 2014. V. 16. № 2. P. 108–120.
- Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y. et al.* “Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells // *Science*. 2002. V. 298. № 5593. P. 597–600.
- Rhie B.-H., Antao A.M., Karapurkar J.K. et al.* Ubiquitin-specific protease 3 deubiquitinates and stabilizes Oct4 protein in human embryonic stem cells // *Intern. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 11. P. 5584.
- Rouhani F.J., Nik-Zainal S., Wuster A. et al.* Mutational history of a human cell lineage from somatic to induced pluripotent stem cells // *PLoS Genetics*. 2016. V. 12. № 4. P. e1005932.
- Saeki Y., Kudo T., Sone T. et al.* Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome // *The EMBO Journal*. 2009. V. 28. № 4. P. 359–371.
- Salghetti S.E., Kim S.Y., Tansey W.P.* Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc // *The EMBO J*. 1999. V. 18. № 3. P. 717–726.
- Sato N., Sanjuan I.M., Heke M. et al.* Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with

- the mouse // *Developmental Biology*. 2003. V. 260. № 2. P. 404–413.
- Schmidt R., Plath K. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation // *Genome Biology*. 2012. V. 13. № 10. P. 251.
- Scholer H.R., Balling R., Hatzopoulos A.K. et al. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis // *The EMBO J*. 1989. V. 8. № 9. P. 2551–2557.
- Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F. et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress // *Cell*. 2010. V. 142. № 4. P. 613–624.
- Selenina A.V., Tsimokha A.S., Tomilin A.N. Proteasomes in protein homeostasis of pluripotent stem cells // *Acta naturae*. 2017. V. 9. № 3. P. 39–47.
- Shiiba I., Takeda K., Nagashima S. et al. Overview of mitochondrial E3 ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 from molecular mechanisms to diseases // *Intern. J. Mol. Sci*. 2020. V. 21. № 11. P. 3781.
- Shin J., Bossenz M., Chung Y. et al. Maternal Rnf12/RLIM is required for imprinted X-chromosome inactivation in mice // *Nature*. 2010. V. 467. № 7318. P. 977–981.
- Sinenko S.A., Starkova T.Y., Kuzmin A.A. et al. Physiological signaling functions of reactive oxygen species in stem cells: From flies to man // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9.
- Stoddard-Bennett T., Reijo Pera R. Treatment of Parkinson's disease through personalized medicine and induced pluripotent stem cells // *Cells*. 2019. V. 8. № 1. P. 26.
- Stohwasser R. Proteasome activator 28γ: Impact on survival signaling and apoptosis // *Current Understanding of Apoptosis: Programmed Cell Death*. 2018. P. 71.
- Strebinger D., Deluz C., Friman E.T. et al. Endogenous fluctuations of OCT 4 and SOX 2 bias pluripotent cell fate decisions // *Mol. Syst. Biol*. 2019. V. 15. № 9. P. e9002.
- Stricker S.H., Feber A., Engström P.G. et al. Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner // *Genes & Development*. 2013. V. 27. № 6. P. 654–669.
- Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 38. P. 5564–5576.
- Sun X.X., He X., Yin L. et al. The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. V. 112. № 12. P. 3734–3739.
- Suresh B., Lee J., Kim K.S. et al. The importance of ubiquitination and deubiquitination in cellular reprogramming // *Stem Cells Intern*. 2016. V. 2016. P. 6705927.
- Sussman R.T., Stanek T.J., Estes P. et al. The epigenetic modifier ubiquitin-specific protease 22 (USP22) regulates embryonic stem cell differentiation via transcriptional repression of sex-determining region Y-box 2 (SOX2) // *The J. Biol. Chem*. 2013. V. 288. № 33. P. 24234–24246.
- Swijnenburg R.-J., Schrepfer S., Govaert J.A. et al. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. V. 105. № 35. P. 12991–12996.
- Szutorisz H., Georgiou A., Tora L. et al. The proteasome restricts permissive transcription at tissue-specific gene loci in embryonic stem cells // *Cell*. 2006. V. 127. № 7. P. 1375–1388.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Takahashi K., Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency // *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2016. V. 17. № 3. P. 183–193.
- Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions // *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biol. Sci*. 2009. V. 85. № 1. P. 12–36.
- Tanaka K. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles // *The Keio J. Medicine*. 2013. V. 62. № 1. P. 1–12.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Tolkunova E., Malashicheva A., Parfenov V.N. et al. PIAS proteins as repressors of Oct4 function // *J. Mol. Biol*. 2007. V. 374. № 5. P. 1200–1212.
- Ustrell V., Hoffman L., Pratt G. et al. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair // *The EMBO J*. 2002. V. 21. № 13. P. 3516–3525.
- van der Stoep P., Boutsma E.A., Hulsman D. et al. Ubiquitin E3 ligase Ring1b/Rnf2 of polycomb repressive complex 1 contributes to stable maintenance of mouse embryonic stem cells // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 5. P. e2235.
- van Pel D.M., Harada K., Song D. et al. Modelling glioma invasion using 3D bioprinting and scaffold-free 3D culture // *J. Cell Communication and Signaling*. 2018. V. 12. № 4. P. 723–730.
- Vilchez D., Boyer L., Morantte I. et al. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11 // *Nature*. 2012. V. 489. № 7415. P. 304–308.
- Vilchez D., Simic M.S., Dillin A. Proteostasis and aging of stem cells // *Trends in Cell Biology*. 2014. V. 24. № 3. P. 161–170.
- von der Lehr N., Johansson S., Wu S. et al. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription // *Molecular Cell*. 2003. V. 11. № 5. P. 1189–1200.
- Wang J., Zhang Y., Hou J. et al. Ube2s regulates Sox2 stability and mouse ES cell maintenance // *Cell Death & Differentiation*. 2016. V. 23. № 3. P. 393–404.
- Wang X., Chemmama I.E., Yu C. et al. The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress // *J. Biol. Chem*. 2017. V. 292. № 39. P. 16310–16320.
- Wang Z., Kang L., Zhang H. et al. AKT drives SOX2 overexpression and cancer cell stemness in esophageal cancer by protecting SOX2 from UBR5-mediated degradation // *Oncogene*. 2019. V. 38. № 26. P. 5250–5264.

- Welcker M., Orian A., Jin J. et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. V. 101. № 24. P. 9085–9090.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. V. 385. № 6619. P. 810–813.
- Wuebben E.L., Rizzino A. The dark side of SOX2: cancer-a comprehensive overview // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 27. P. 44917.
- Xu H., Wang W., Li C. et al. WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells // *Cell Research*. 2009a. V. 19. № 5. P. 561–573.
- Xu H.M., Liao B., Zhang Q.J. et al. Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination // *The J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 22. P. 23495–23503.
- Xu P., Duong D.M., Seyfried N.T. et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation // *Cell*. 2009b. V. 137. № 1. P. 133–145.
- Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges // *Cell Stem. Cell*. 2020. V. 27. № 4. P. 523–531.
- Yang B.-J., Han X.-X., Yin L.-L. et al. Arabidopsis PROTEASOME REGULATOR1 is required for auxin-mediated suppression of proteasome activity and regulates auxin signalling // *Nature Communications*. 2016. V. 7. № 1. P. 1–9.
- Ying Q.-L., Nichols J., Evans E.P. et al. Changing potency by spontaneous fusion // *Nature*. 2002. V. 416. № 6880. P. 545–548.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Yuan J., Minter-Dykhouse K., Lou Z. A c-Myc–SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation // *J. Cell Biol* 2009. V. 185. № 2. P. 203–211.
- Zhang C., Hoang N., Leng F. et al. LSD1 demethylase and the methyl-binding protein PHF20L1 prevent SET7 methyltransferase-dependent proteolysis of the stem-cell protein SOX2 // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 10. P. 3663–3674.
- Zhang C., Leng F., Saxena L. et al. Proteolysis of methylated SOX2 protein is regulated by L3MBTL3 and CRL4DCAF5 ubiquitin ligase // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 2. P. 476–489.
- Zhang L., Huang H., Zhou F. et al. RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 5. P. 650–661.
- Zhong L., Belote J.M. The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis // *Development*. 2007. V. 134. № 19. P. 3517–3525.
- Zhou G., Meng S., Li Y. et al. Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming // *Cell Reports*. 2016. V. 15. № 5. P. 919–925.
- Zhou H., Liu Y., Zhu R. et al. FBXO32 suppresses breast cancer tumorigenesis through targeting KLF4 to proteasomal degradation // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 23. P. 3312–3321.

Ubiquitin-Proteasome System in Cell Pluripotency and Reprogramming

I. V. Zubarev¹, U. I. Podenkova¹, A. N. Tomilin¹, and A. S. Tsimokha^{1, *}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: atsimokha@incras.ru*

Embryonic stem cells (ESCs) are derived from cells in the early-stage pre-implantation embryo and have the potential to differentiate to all three embryonic germ layers. Induced pluripotent stem cells (iPSCs), which have features similar to ESCs, can also provide important insights into mammalian development and be found wide applications in cell therapy and disease modeling. Understanding the mechanisms of self-renewal and differentiation, as well as cell reprogramming, is a central issue in using ESCs and iPSCs for cell therapy. The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays one of the key roles in most of cellular processes by tightly regulating protein degradation. The review focuses on the regulatory role of UPS in cell pluripotency and reprogramming.

Keywords: pluripotent stem cells, proteasome, proteolysis, ubiquitin-proteasome system, embryonic stem cells

УДК 576.53, 57.085.23

ГЕМОПОЭТИЧЕСКАЯ СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА И НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ ГЕМОПОЭЗА: МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

© 2022 г. О. Н. Шевелева^а *, И. В. Лядова^а^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: on_sheveleva@mail.ru

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 17.08.2022 г.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) долгое время оставались одними из самых хорошо изученных стволовых клеток. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования позволили охарактеризовать основные свойства ГСК, разработать методические подходы к их анализу и в конечном итоге привели к формированию иерархической теории кроветворения. Согласно иерархической теории кроветворения ГСК рассматриваются как основа разветвленного дерева кроветворных предшественников, в процессе дифференцировки которых теряется способность клеток к самообновлению (т.е. к поддержанию собственной популяции), происходит переход от мультипотентности к олиго- и унипотентности и образуются дифференцированные клетки крови различной линейной принадлежности. Во многом благодаря разработке и внедрению новых высокотехнологичных методов анализа дифференцировки клеток, представления о строгой последовательности дифференцировки ГСК в последнее время изменились. В частности, получены доказательства гетерогенности и частичной коммитированности ГСК, новые данные о взаимоотношениях между отдельными популяциями мультипотентных предшественников, значительно расширены представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих поддержание и дифференцировку ГСК. Настоящий обзор посвящен рассмотрению основных характеристик ГСК, методических подходов, используемых для их изучения и рассмотрению современных взглядов на ранние стадии гемопоэза.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэз, гетерогенность, иерархия

DOI: 10.31857/S0475145022060076

ВВЕДЕНИЕ

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – тканеспецифичные стволовые клетки, характеризующиеся способностью дифференцироваться во все типы клеток крови – эритроциты, тромбоциты, лейкоциты. Процесс образования клеток крови из относительно небольшого числа гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) называется гемопоэзом. Как и для других стволовых клеток, основными характеристиками ГСК являются способность к самообновлению и способность давать начало разным типам клеток (мультипотентность) (Гордеев и др., 2021). Отличительной характеристикой ГСПК является интенсивность процесса образования из них дифференцированных клеток: по последним оценкам в сутки в организме человека образуется $0.33 \pm 0.02 \times 10^{12}$ клеток, из которых более 85% составляют клетки крови (Sender, Milo, 2021). Сочетание указанных характеристик обуславливает высокую репопулирующую способность ГСК

(т.е. способность восстанавливать гемопоэз после трансплантации реципиенту) и высокий клинический потенциал их применения.

Долгое время считалось, что гемопоэз достаточно хорошо изучен. Существовала детальная общепринятая иерархическая модель гемопоэза, в которой каждая отдельная популяция кроветворных предшественников была функционально и фенотипически охарактеризована (рис. 1-Г). Однако в последнее десятилетие, во многом благодаря появлению технологий анализа на уровне единичных клеток, устоявшиеся взгляды на пути дифференцировки и однородность клеток внутри популяций ГСК и ГСПК стали меняться. Во многих исследованиях была показана гетерогенность считавшейся ранее однородной популяции ГСК (Paul et al., 2015; Naas et al., 2018; Zhang et al., 2022). При этом применение ГСК в клинической практике требует понимания биологии этих клеток, механизмов их образования, поддержания и дифференцировки, наличия и совершенствования методов их идентификации и выделения. В

настоящее время основные проблемы в исследовании ГСК связаны с их распознаванием и изоляцией, поиском подходов к их изучению, не приводящих к получению артефактов, идентификацией молекулярных регуляторов, связанных с их функционированием, и соотношением новых данных с принятой парадигмой. Настоящий обзор посвящен рассмотрению биологии ГСК, методических подходов, используемых для их изучения и рассмотрению современных взглядов на ранние стадии гемопоэза.

ОБРАЗОВАНИЕ ГСК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Представления о становлении гемопоэза и образовании ГСК в эмбриогенезе основаны, главным образом, на экспериментальных исследованиях на мышах. В эмбриогенезе кроветворение устанавливается в три этапа, которые называют «волнами» гемопоэза – примитивный гемопоэз, прединитивный и дефинитивный (Dzierzak et al., 2018). Примитивный гемопоэз происходит внеэмбрионально в желточном мешке (начиная со стадии E7.0–E7.5 у мышей и на 16–18.5 сут после оплодотворения у человека) и характеризуется образованием примитивных эритроидных клеток, содержащих крупные ядра и эмбриональный гемоглобин, мегакариоцитов, отличающихся от взрослых мегакариоцитов размером и полиплоидией, и эмбриональных макрофагов (Kennedy et al., 2007; Sanu et al., 2021). В настоящее время единой точки зрения о природе предшественника этих клеток нет. Среди возможных источников этих клеток называют гемангиобласт (клетка-предшественник, обладающая как гемопоэтическим, так и эндотелиальным потенциалом), гемогенный эндотелий (эндотелий, обладающий способностью давать начало гемопоэтическим клеткам) или непосредственно клетки мезодермы (Lacaud, Kouskoff, 2017; Wittamer, Bertrand, 2020). На стадии прединитивного гемопоэза, происходящей также в желточном мешке, образуется гемогенный эндотелий, а из него – единый эритромиелоидный предшественник (ЕМР), дающий начало эритроидным клеткам, мигрирующим в фетальную печень, мегакариоцитам и макрофагам (начиная со стадии E8.25 у мышей и на 28–35 сут после оплодотворения у человека). Помимо ЕМР, на этой стадии образуется лимфоидный предшественник, способный давать начало В-лимфоцитам (Palis et al., 2001; McGrath et al., 2015; Wittamer, Bertrand, 2020). ГСК как единая клетка-предшественник, способная давать начало всем линиям клеток крови, на данной стадии эмбрионального развития еще отсутствует. ГСК образуются в третью волну гемопоэза (начиная со стадии E10.5 для мыши, 26–42 сут после оплодотворения для человека) из гемогенного эндотелия в области аорто-гонадо-мезонефроса (АГМ) в результате эндотелиально-крово-

творного перехода (Medvinsky et al., 2011). Клетки этой области постепенно теряют эндотелиальные характеристики и приобретают фенотип и морфологию ГСК (Lange et al., 2021). Происхождение ГСК именно из эндотелиальных клеток дорсальной аорты, входящей в состав АГМ, а не из лежащей в его основе мезенхимы, было убедительно показано с помощью покадровой визуализации под конфокальным микроскопом и внесения генетической метки в эндотелиальные клетки с использованием мышей с репортерным геном LacZ (Zovein et al., 2008; Boisset et al., 2010). ГСК АГМ неспособны к дифференцировке *in situ*. При этом способность к самообновлению у зародышевых ГСК существенно превышает такую способность у ГСК из костного мозга взрослых особей (Ivanovs et al., 2011). Помимо АГМ в зародыше существуют и другие области, по-видимому, способные генерировать ГСК – это желточные и пуповинные артерии, плацента и голова зародыша (Marella et al., 2000; Gekas et al., 2005; Ivanovs et al.; 2011; Li et al., 2012). Как соотносятся между собой ГСК из разных областей зародыша еще предстоит выяснить. Для дифференцировки ГСК необходима их миграция из области АГМ в печень плода, где происходит экспансия и образование кроветворных предшественников (Godin et al., 1999; Ema et al., 2000). Миграция в эмбриональную печень происходит начиная с 11-го дня развития у мыши и 28-го дня развития у человека. После колонизации печени ГСПК мигрируют в тимус и селезенку (стадия E11–12), а затем, незадолго до рождения ГСК из фетальной печени заселяют костный мозг (Mazo et al., 2011). Одна из функций костномозгового микроокружения, ниши, заключается в поддержании пула ГСК в состоянии покоя. Таким образом происходит становление постнатального гемопоэза.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ГСК И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИЕРАРХИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ГЕМОПОЭЗА

Положение о существовании единой стволовой кроветворной клетки, дающей начало всем кроветворным клеткам, берет свое начало из работ А.А. Максимова и его унитарной теории кроветворения (Maximow et al., 1924). В настоящее время ГСК считаются одними из самых хорошо охарактеризованных тканеспецифических стволовых клеток.

Основными свойствами ГСК являются способность длительное время находиться в покоящемся состоянии, способность к самоподдержанию (самообновлению), дифференцировке в различные клеточные типы (мультипотентность), а также способность к мобилизации для пополнения пула кроветворных клеток в условиях стресса. Эти свойства позволяют ГСК постоянно поддер-

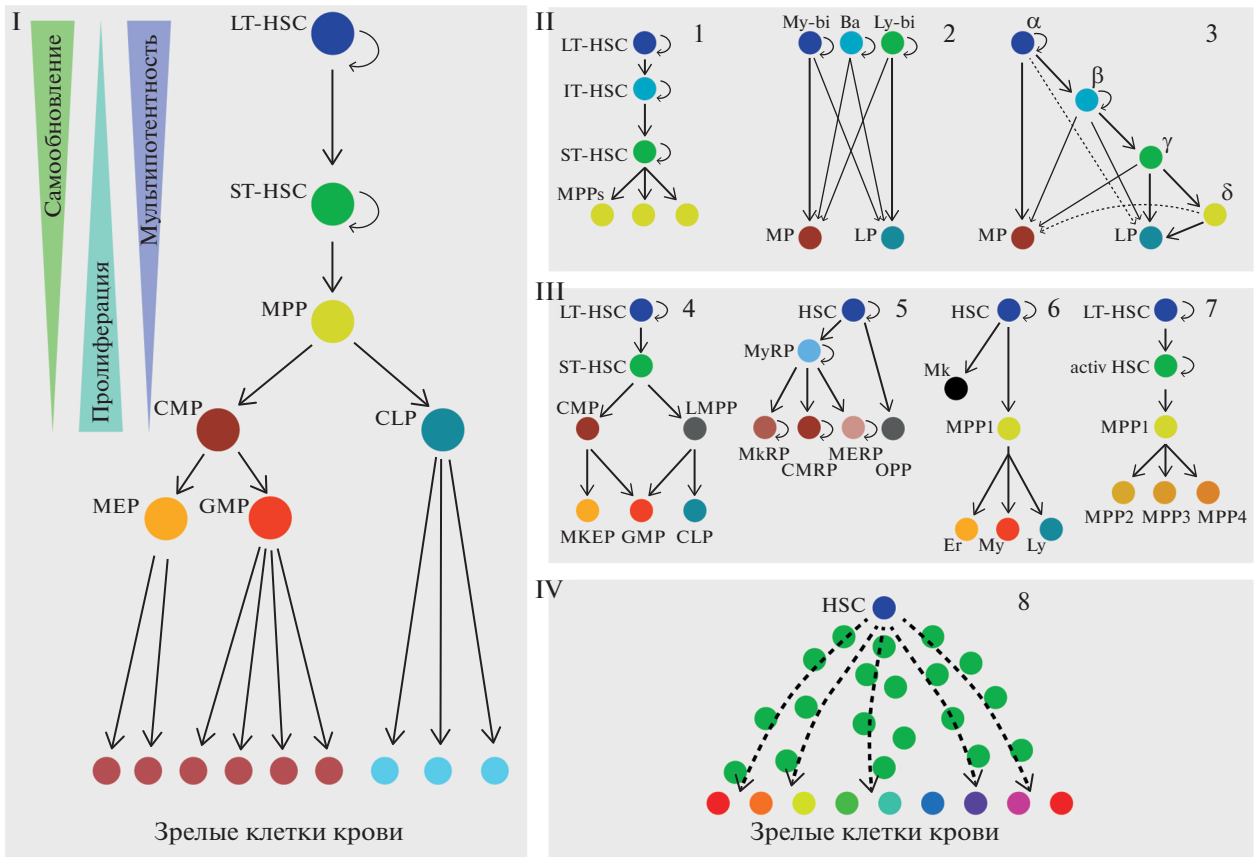


Рис. 1. Изменение представлений о кроветворении и модели гемопоэза. I – Иерархическая модель гемопоэза. Дискретные популяции, ступенчатая дифференцировка. LT-HSC дифференцируются в ST-HSC, которые дифференцируются в MPP. Первая точка бифуркации происходит при дифференцировке MPP по двум возможным направлениям – CMP и CLP. По ходу дифференцировки кроветворных предшественников снижается способность к самообновлению и дифференцировочные потенции, усиливается пролиферативная активность. II – Появление первых данных о гетерогенности ГСК. 1 – Классическая модель гемопоэза с введением промежуточной популяции ГСК (IT-HSC) (Benveniste et al., 2010). 2 – “My-Bi и Ly-Bi” модель, в которой демонстрируется присутствие трех разных популяций ГСК, прекоммитированных к дифференцировке в большей степени в миелоидном направлении (My-bi), в лимфоидном (Ly-Bi) и “сбалансированные” ГСК (Ba) (Muller-Sieburg et al., 2002). 3 – Модель “α, β, γ, δ” ГСК, демонстрирующая присутствие четырех разных популяций ГСК, отличающихся по своим дифференцировочным потенциям, коммитированности к дифференцировке по лимфоидному или миелоидному пути и способностям к самообновлению (Dykstra et al., 2007). III – Изменение представлений о точках бифуркации в раннем гемопоэзе и мультипотентных кроветворных предшественниках. 4 – Идентификация нового предшественника – LMPP, который утрачивает способность дифференцироваться в мегакариоцитарно-эритроидном направлении (Adolfsson et al., 2005). 5 – Модель “миелоидного шунтирования”, показывающая ранее ответвление миелоидно-ограниченных репопулирующих предшественников (Yamamoto et al., 2013). 6 – Модель, демонстрирующая ранее ответвление мегакариоцитарного предшественника (Notta et al. 2016). 7 – Модель гетерогенности популяции MPP. MPP подразделены на MPP1-, 2-, 3-, 4-. MPP1 дает начало всем линиям, MPP2/3 коммитированы в миелоидном направлении, а MPP4 – в лимфоидном (Pietras et al., 2015). IV (8) – Модель непрерывной дифференцировки, “континуума кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников”. Дискретные популяции отсутствуют, кроветворные предшественники постепенно приобретают коммитированность к дифференцировке в определенном направлении (Quesenberry et al., 2017; Velten et al., 2017; Cheng et al., 2020). LT-HSC – длительно репопулирующие ГСК, ST-HSC – коротко репопулирующие ГСК, IT-HSC – промежуточные ГСК, MPP – мультипотентные предшественники, CMP – общие миелоидные предшественники, CLP – общие лимфоидные предшественники, MEP – мегакариоцитарно-эритроидные предшественники, GMP – гранулоцитомоноцитарные предшественники, My-bi – миелоид-смещенные ГСК, Ba – сбалансированные ГСК, Ly-bi – лимфоид-смещенные ГСК, MP-миелоидные предшественники, LP – лимфоидные предшественники, LMPP – лимфоид-прайммированные мультипотентные предшественники, MKEP – мегакариоцитарно-эритроидные предшественники, MyRP – миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники, MkRP – репопулирующие предшественники мегакариоцитов, CMRP – репопулирующие предшественники миелоидных клеток, MERP – мегакариоцитарно-эритроидные репопулирующие предшественники, OPP – олигопотентные предшественники, олиго- и унипотентные предшественники мегакариоцитов (Mk), эритроцитов (Er), клеток миелоидной (My) и лимфоидной (Ly) линий. Круглыми стрелками показана способность к самообновлению.

живать кроветворение и восстанавливать его после трансплантации. Важно отметить, что “умение” ГСК одновременно восполнять собственную популяцию и дифференцироваться, давая разные типы клеток, характерное для стволовых клеток, обеспечивается их способностью к асимметричному делению (Терских и др., 2007). В процессе гемопоэза, по мере дифференцировки ГСК, у клеток исчезает способность к самообновлению, увеличивается пролиферативная активность, происходит переход от мульти- к олиго- и унипотентности, что приводит к снижению (исчезновению) репопулирующей способности. Указанные изменения сопровождаются изменением эпигенома, транскриптомного и протеомного профилей клеток, а также поверхностного фенотипа клетки.

Изучение ГСК на мышинных моделях привело к созданию иерархической модели кроветворения, выделению и детальной характеристике различных популяций кроветворных клеток. Классическая иерархическая модель, общепринятая до недавнего времени, представляет гемопоэз, как пошаговый процесс перехода от ГСК и мультипотентных предшественников к олиго- и унипотентным предшественникам и, наконец, к зрелым клеткам крови (рис. 1-1). Обычно схему гемопоэза представляют в виде разветвленного дерева, на вершине которого находятся длительно репопулирующие ГСК (LT-HSCs), характеризующиеся высокой способностью к самообновлению и долгосрочному (не менее 16 недель) восстановлению кроветворения при трансплантациях, далее следуют коротко репопулирующие ГСК (ST-HSCs), обладающие ограниченными способностями к самообновлению и восстановлению кроветворения (как правило, меньше, чем на 4 нед.) и затем — мультипотентные предшественники (MPP), не обладающие способностью к самообновлению и восстановлению кроветворения после трансплантации летально облученным животным (Vnyder et al., 2006; Challen et al., 2010). Некоторые авторы, учитывая разную динамику восстановления миелоидных и лимфоидных клонов после трансплантации, предлагают анализировать периферическую кровь реципиентов трижды, например, через 1–2, 4–6 и 8–12 мес. после трансплантации или через 1–2 и 4–6 мес. после первичной трансплантации и через 4–6 мес. после вторичной. В этом случае LT-HSCs определяются как ГСК, поддерживающие восстановление гранулоцитов от 2 до 12 мес. и более, ST-HSCs — до 2-х мес. после трансплантации (как обсуждается ниже, клетки, поддерживающие кроветворение до 8 мес., относят к отдельной популяции “промежуточных” ГСК (intermediate-term HSCs, IT-HSC) (Ema et al., 2014). В ряду LT-HSCs → ST-HSCs → MPPs наблюдается снижение способности к репопуляции и повышение пролиферативного потенциала. От MPPs начинаются разветвления (бифуркации) и

снижение дифференцировочных потенциалов клеток (Doulatov et al., 2012). MPPs дают олигопотентные общие миелоидные предшественники (CMPs) и общие лимфоидные предшественники (CLPs) (табл. 1, рис. 1-1). В последние годы с появлением новых методов исследований происходит пересмотр “классической” иерархической модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГСК

Существует несколько методических подходов к исследованию ГСК. Основными являются — клональный анализ, проточная цитометрия, трансплантация, в последние годы — анализ на уровне единичных клеток (single-cell). Поскольку для обеспечения кроветворения и для клинического применения ГСК репопулирующая способность является ключевой, ее оценке уделяется наибольшее внимание исследователей.

Клональный анализ

Одним из самых первых методов анализа ГСК стал клональный анализ. В его основу легли эксперименты Тилла и Мак Куллоха, в которых было показано образование колоний разного типа кроветворных клеток в селезенке летально облученных мышей-реципиентов при трансплантации им клеток сингенного костного мозга. Мультипотентные предшественники, дающие начало разным типам кроветворных клеток, были названы авторами КОЕ-С (колониеобразующие единицы селезенки) (Till and McCulloch, 1961). По мере развития методов культивирования ГСК, клональный анализ стал проводиться и в системах *in vitro*. Для получения культур кроветворных клеток *in vitro* были разработаны методы культивирования на агаровом покрытии и фидерном слое из клеток периферической крови, что позволяло стимулировать образование колоний и минимизировать их слияние (Pike, Robinson, 1970). Дальнейшее развитие метода шло по пути использования различных смесей цитокинов и разных фидерных слоев, в том числе — из стромальных клеток, и привело к увеличению эффективности и чувствительности метода (Dexter, Lajtha, 1974; McNiece et al., 1989; Itoh et al., 1989; Koller et al., 1998; Majumdar et al., 2000; Kadereit et al., 2002). На современном этапе при проведении клонального анализа, как правило, используют готовые коммерческие среды на основе метилцеллюлозы, содержащие различные комбинации цитокинов (SCF, IL-6, IL-3, EPO и др.). Цитокины обеспечивают пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических прогениторных клеток, приводя к образованию колоний, а метилцеллюлозная основа предупреждает слияние одиночных колоний. В зависимости от состава среды, клональный анализ

Таблица 1. Краткая характеристика ГСК и основных кроветворных предшественников, согласно классической схеме кроветворения

Название популяции	Фенотип для мыши	Фенотип для человека	Дифференцировочные потенции	Характеристика популяции	Ссылки
LT-HSC	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁻ CD135 ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻	Lin ⁻ , CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD45RA ⁻ , Thy-1 ⁺ , Rhodamin123 ^{Low} , CD49f ⁺	Все типы кроветворных клеток	Мультипотентные, имеют широкий потенциал к самообновлению, находясь в состоянии покоя (G0 стадия), восстанавливают кроветворение у вторичных реципиентов	Okada et al., 1992; Morrison, Weissman, 1994; Yang et al., 2005; Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Passegue et al., 2005; Majeti et al., 2007; Challen et al., 2009; Notta et al., 2011; Wilkinson et al., 2020
ST-HSC	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ CD135 ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻		Все типы кроветворных клеток		
MPP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ CD135 ⁺ CD150 ^{+/+} CD48 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD90 ⁻ CD49F ⁻	Все типы кроветворных клеток	Мультипотентные, способность к самообновлению отсутствует, пролиферативная активность	Majeti et al., 2007; Akala et al., 2008; Oguro et al., 2013; Eich et al., 2019
CMF	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁺ CD34 ⁺ CD16/32 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁻	Гранулоцитарно-макрофагальные предшественники и мегакариоцитарно-эритроцитарные предшественники	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Ishikawa et al., 2007; Giebel, Punzel, 2008
CLP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ I17α ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{-/low} CD45RA ⁺ CD90 ⁻	В-лимфоциты, Т-лимфоциты и NK-клетки	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Ishikawa et al., 2007; Giebel, Punzel, 2008
MEP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁻ CD34 ⁻ CD16/32 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{low} CD45RA ⁻ IL3Rα ⁻	Мегакариоциты и эритроциты	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Giebel, Punzel, 2008
GMP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁺ IL3Rα ^{low}	Гранулоциты, макрофаги и дендритные клетки	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Giebel, Punzel, 2008

позволяет идентифицировать эритроидные (BFU-E и CFU-E), гранулоцитарно-макрофагальные (CFU-GM, CFU-G и CFU-M), мультипотентные гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные и мегакариоцитарные предшественники (CFU-GEMM), а также В-лимфоидные прогениторные клетки. Например, среда MethoCult™ Optimum подходит для идентификации CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, а такая же среда без эритропоэтина только для идентификации CFU-GM (https://www.stemcell.com/media/files/wallchart/WA10002Colonies_Derived_Human_Hematopoietic_Progenitors.pdf). При учете результатов (как правило, через 9–14 дней) анализируют морфологию образовавшихся колоний (возможно сочетание с фенотипированием) и определяют число каждого типа колоний (Canete et al., 2017; Husa et al., 2018; Ruiz et al., 2019; Kronstein-Wiedemann, Tonn, 2019). Для упрощения анализа разработаны среды, обеспечивающие ускоренное образование колоний (MethoCult™ express – <https://www.stemcell.com/methocult-express.html>), а также система визуализации (STEMvision™ – <https://www.stemcell.com/stemvision.html>, Velier et al., 2019).

Клональный анализ позволяет определить количество мультипотентных и коммитированных линейных предшественников, оценить мультипотентность исследуемой клеточной популяции, может быть использован для изучения влияния различных факторов на кроветворение (Gordon, 1993; Pessina et al., 2003, 2005; Pereira et al., 2007; Nishikawa et al., 2016; Canete et al., 2017; Kronstein-Wiedemann, Tonn, 2019), однако, он не позволяет судить о способности исследуемых клеток к самоподдержанию и не отражает их репопулирующей способности.

Для оценки способности исследуемых клеток к длительному самоподдержанию были разработаны так называемые длительные культуры (long-term cultures, LTC). LTC основаны на длительном (в течение нескольких (4–5) нед.) культивировании исследуемой популяции клеток на монослое стромальных клеток или стромальных клеточных линий (Kadereit et al., 2002; Carreras et al., 2021). Клетки, исследуемые в LTC, называют клетками, способными инициировать длительные культуры (LTC-initiating cells, LTV-ICs). Клетки, образованные в культурах LTC, в дальнейшем переносят в метилцеллюлозные среды и оценивают образование колоний различного типа. В другом варианте длительных культур образованные в них клетки анализируют морфологически *in situ*, без помещения в новые культуры – по образованию так называемой “области булыжника”. Для понимания того, каким образом проводилась детекция клеток, клетки, идентифицируемые в этом тесте, называют клетками, образующими области булыжника, а сам тест – тестом на клетки, образующие

область булыжника (cobblestone area-forming cell (CAFC) assay) (Amarachintha, Pang, 2018).

Для получения более точных результатов при проведении клонального анализа используют метод лимитирующих разведений или культивируют единичные клетки (одна клетка на лунку) в микроплатах (Gordon, 1993; Kent et al., 2013). Для изначального выделения определенных предшественников необходима тщательная предварительная сортировка клеток.

Проточная цитометрия и сортировка клеток

Проточная цитометрия позволяет идентифицировать ГСК, различные популяции прогениторных и дифференцированных клеток на основе их поверхностного фенотипа – совокупности экспрессируемых на поверхности клетки маркеров. Одного надежного маркера ГСК не существует, их идентифицируют по совокупности фенотипических маркеров. При этом маркеры, используемые для идентификации ГСК мыши и человека, существенно различаются. Поскольку ГСК мыши охарактеризованы более детально, в дальнейшем нами будет преимущественно рассматриваться фенотип ГСК, мультипотентных и олигопотентных предшественников мыши; сведения об основных маркерах этих популяций у человека приведены в табл. 1. Общей характеристикой ГСК является отсутствие экспрессии на них маркеров зрелых гемопоэтических клеток – CD2 (Т-лимфоциты и НК-клетки), CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и др.), CD8 (Т-лимфоциты и НК), NK1.1 (НК), B220 (В-лимфоциты), TER-119 (эритроидные клетки), CD19 (В-лимфоциты), Mac-1 (гранулоциты, НК, макрофаги) и Gr-1 (гранулоциты, макрофаги) для мыши и CD2, CD3, CD14 (моноциты), CD16 (НК, гранулоциты), CD19, CD20 (В-лимфоциты), CD56 (НК-клетки), CD11b (гранулоциты, макрофаги, моноциты) и CD235a (эритроидные клетки) для человека (Reitsma et al., 2002; Forraz et al., 2004; Frascoli et al., 2012; Norhaiza et al., 2013). В связи с этим к ГСК применяют термин “lineage negative cells” (Lin⁻). Помимо отсутствия экспрессии “линейных” маркеров, для ГСК мыши характерна экспрессия c-Kit (CD117, рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток, рецепторная тирозинкиназа III) и Sca-1 (“stem cell antigen-1”, антиген стволовых клеток-1). Клетки Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ содержат LT-HSCs, ST-HSCs и MPPs; для идентификации LT-HSCs используют дополнительные маркеры: CD34 и CD135 (фенотип LT-HSC CD34⁻CD135⁻) и/или CD150 и CD48 (фенотип CD150⁺CD48⁻, однако такой же фенотип имеют и ST-HSCs), а также детекцию так называемой

“боковой” популяции после обработки клеток ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 (ГСК обладают высокой способностью к его элиминации). ST-HSCs имеют фенотип $CD34^+ CD135^- CD150^+ CD48^-$, а MPPs – $CD34^+ CD135^+ CD150^{+/-} CD48^-$ (табл. 1) (Yang et al., 2005; Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Challen et al., 2009; Oguro et al., 2013; Eich et al., 2019). Для идентификации более дифференцированных олигопотентных популяций используют другие панели маркеров, их подробное рассмотрение выходит за рамки настоящего обзора (Kondo et al., 1997; Giebel, Punzel, 2008; Challen et al., 2009; Mayle et al., 2013). С целью использования в исследованиях оптимальных наборов маркеров для точной идентификации популяций гемопоэтических клеток, а также для сокращения времени на поиск маркеров и отработку метода, рекомендуется применение оптимизированных многоцветных панелей, предложенных в OMIP (Eich et al., 2019).

ГСК человека идентифицируют на основе другого набора маркеров, в большинстве исследований – по фенотипу $Lin^- CD34^+ CD38^- CD45RA^- CD90^+ CD49f^+$ (Majeti et al., 2007; Notta et al., 2011). Важно отметить, что экспрессия $CD34$ отличается ГСК человека от LT-HSCs мыши (последние имеют фенотип $CD34^-$), что может быть связано как с межвидовыми различиями и отсутствием у человека популяции ГСК $CD34^-$, так и с тем, что доступные подходы к изучению ГСК человека не позволяют идентифицировать у человека малочисленную популяцию ГСК $CD34^-$ аналогичную мышинным LT-HSC. Косвенным подтверждением второго объяснения являются данные о присутствии в пуповинной крови человека клеток $CD34^-$, обладающих высоким репопулирующим потенциалом (Doulatov et al., 2012; Sumide et al., 2018).

Преимуществами проточной цитометрии является относительная простота метода и быстрое получение результата, проведение анализа на уровне единичных клеток, возможность многопараметрической оценки фенотипа клеток (с дополнительным анализом пролиферативной активности или внутриклеточного содержания отдельных факторов). Однако проведение многопараметрической проточной цитометрии характеризуется высокими рисками получения артефактов, в связи с чем требуется соответствующий уровень подготовки исследователя. Кроме того, данный метод не позволяет оценить ни мультипотентность, ни репопулирующую способность клеточных популяций – характеристики, являющиеся основными для подтверждения природы ГСК.

Трансплантация

Трансплантационный метод основан на переносе исследуемой популяции клеток летально облученным реципиентам с последующей детекцией и фенотипированием клеток донора, оценкой линейной принадлежности их потомков, скорости и длительности восстановления гемопоэза. Определение этих показателей позволяет судить о репопулирующей способности клеток донора и их мультипотентности – т.е. оценить основные критерии ГСК. Сочетание трансплантационного метода с предварительной сортировкой переносимых клеточных популяций позволяет делать выводы о репопулирующем и дифференцировочном потенциале отдельных клеточных субпопуляций и является основой для уточнения путей гемопоэза.

При применении трансплантационного метода важным является точная идентификация донорских клеток в организме реципиента. Метод трансплантации костного мозга летально облученным реципиентам был детально разработан в лаборатории Н.Г. Хрущева еще в 70-х гг. прошлого века для создания ксеногенных радиационных химер (Васильева и др., 1978). Разработка методов точной идентификации донорских клеток в организме реципиента позволила применять его для анализа, в том числе, при переносе сингенных клеток донора. Используемые в настоящее время подходы включают работу с трансгенными животными, у которых во всех кроветворных клетках стабильно экспрессируется флуоресцентный белок, использование доноров, отличающихся от реципиента по аллельным вариантам одного из генов (преимущественно *Ptprc*, имеющего аллельные варианты *CD45.1* и *CD45.2*), а также баркодирование клеток с использованием ретровирусных конструкций (Osawa et al., 1996; Gerrits et al., 2010; Yamamoto et al., 2013). Метод идентификации клеток по аллелям *CD45* подходит для оценки количества донорских клеток в популяциях миелоидных клеток, Т- и В-лимфоцитов, но не подходит для оценки донорского вклада в эритропоэз и тромбопоэз (в связи с отсутствием экспрессии *CD45* на этих популяциях). В последних двух случаях в качестве донора используют трансгенных животных с экспрессией флуоресцентных белков, например, мышей *KuO* с экспрессией красного флуоресцентного белка *Kusabiga-Orange*, или мышей с экспрессией зеленого флуоресцентного белка – *Pdzk1ip1-GFP* или *Vwf-GFP* (Yamamoto et al., 2013; Sanjuan-Pla et al., 2013; Sawai et al., 2016).

Для более точного анализа применяют модификации трансплантационного метода, основными являются: серийные трансплантации (серийный перенос) и конкурентный перенос. При серийной трансплантации клетки донора вводят

первичным реципиентам, через 4–8 мес. выделяют клетки костного мозга и переносят их вторичным реципиентам (возможен дальнейший перенос третичным реципиентам) с последующей идентификацией и характеристикой потомков клеток первичного донора. Поскольку восстановление кроветворения у вторичных (третичных) реципиентов возможно только в случае присутствия LT-HSCs в исходной популяции донорских клеток (ST-HSCs не способны восстанавливать кроветворение у вторичного реципиента (Wilkinson et al., 2020)), метод используется для точной идентификации LT-HSCs и является основным методом оценки репопулирующей способности исследуемых клеток.

Конкурентный перенос позволяет отслеживать судьбу единичных клеток донора в организме реципиента. Поскольку перенос единичных клеток не может защитить летально-облученного реципиента от гибели (для защиты необходим перенос не менее $2-3 \times 10^5$ гемопоэтических клеток), одновременно с исследуемыми клетками переносят клетки-конкуренты, которые отличаются от потомков исследуемых индивидуальных клеток с использованием вышеупомянутых подходов (Carrelha et al., 2020).

Метод трансплантации является основным при изучении ГСК на мышинных моделях. Для изучения гемопоэза человека проводят ксенотрансплантации, перенося исследуемые популяции клеток иммунодефицитным мышам. В качестве реципиентов в разных работах использовались мыши с нарушенной функцией Т-лимфоцитов (мышь Nude, мутация в гене *Foxn1*), Т- и В-лимфоцитов (мышь SCID, мутации в генах *Rag*, В-лимфоцитов (мышь *xid* с мутацией в гене тирозинкиназы *Btk*), Т-лимфоцитов и фагоцитов (NOD-SCID), NK-клеток (мышь Bg с мутацией *beige*), Т-лимфоцитов, макрофагов и NK-клеток (NOD-SCID- $\beta 2m^{-/-}$; NOD-Scid-IL2Rnull (NSG), Nu/Bg/XID (BNX) (Bosma et al., 1983; Ito et al., 2008; Pearson et al., 2008; Doulatov et al., 2012)). Проведенные исследования показали, что относительно высокого уровня приживления клеток человека можно достичь только при использовании реципиентов, имеющих нарушение ответа одновременно лимфоцитов, макрофагов и NK-клеток (Arakawa-Hoyt et al., 1999; Dick et al., 1997; Doulatov et al., 2012; Shultz et al., 2005). Для дальнейшего повышения приживления ксеногенных клеток человека в последнее десятилетие применяют иммунодефицитных гуманизированных мышей с введенными фрагментами фетальных тимуса, селезенки или костей человека или чаще со встроенными генами, кодирующими цитокины человека, что способствует поддержанию и дифференцировке гемопоэтических клеток человека. У таких мышей наблюдается поддержание человеческого кроветворения более 12 нед. и образуются крове-

творные колонии всех типов (Fraser et al., 1995; Willinger et al., 2011; Doulatov et al., 2012; Theocharides et al., 2016; Shan et al., 2022).

Появляются вопросы к применению трансплантации как метода исследования нативного кроветворения и выявления истинных LT-HSCs, поскольку уже сама трансплантация может влиять на статус этих клеток. Например, с помощью технологий генетического мечения *in situ*, показано, что в нативных, физиологических, в отличие от стрессовых, трансплантационных, условиях LT-HSCs имеют весьма ограниченный вклад в кроветворение в течение большей части жизни, в отличие от долгоживущих предшественников (Sun et al., 2014). Такие работы ставят под сомнение производство всех типов кроветворных клеток из небольшого числа ГСК на протяжении всей жизни человека и открывают новые перспективы в изучении старения и заболеваний кроветворной системы. Несмотря на это, трансплантационный метод, по-прежнему остается “золотым стандартом” для идентификации ГСК, доказательства наличия у клеток репопулирующей способности и оценки их мультипотентности. Ограничениями метода являются высокая трудоемкость и времязатратность, а также получение информации об относительно небольшом количестве клеток. Тем не менее, именно исследования с использованием трансплантационного метода (в сочетании с сортировкой клеток и анализом единичных клеток) привели к существенному прорыву в изучении биологии ГСК и коррекции наших представлений о начальных этапах гемопоэза.

Анализ на уровне единичных клеток

Огромный вклад в изучение гемопоэза вносят методы геномного, транскриптомного, эпигенетического и протеомного профилирования. Детали, преимущества и ограничения различных методов обобщены в серии недавно опубликованных обзорных статей и выходят за рамки настоящего обзора (Lee et al., 2020; Slovin et al., 2021; Pham et al., 2021). Относительно недавний переход этих методов на уровень анализа единичных клеток, в первую очередь – разработка методов РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq), создают уникальные, ранее недоступные, возможности в области изучения гемопоэза. Доступные в настоящее время платформы scRNA-seq представлены двумя типами: на основе капель (Drop-seq, inDrop, 10 \times Genomics, Seq-well) и на основе планшетов (STRT-seq, SmartSeq, MARS-Seq). Секвенирование на основе капель обладает большей пропускной способностью, позволяет анализировать большое разнообразие клеток. Методы на основе планшетов обладают меньшей пропускной способностью, эффективны для про-

филирования меньшего числа клеток, но обладают большей чувствительностью. Для исследования гемопоэза применяют обе эти платформы (Paul et al., 2015; Zheng et al., 2018; Zhao et al., 2020; Hou et al., 2020). Их использование уже привело к получению новых данных о гетерогенности ГСПК, траекториях их дифференцировки, изменения активности генов и генных сетей в процессе дифференцировки, влияния различных факторов на молекулярный статус и направление клеточной дифференцировки. (см. раздел “Современные представления о начальных стадиях гемопоэза”, Rodriguez-Fraticelli et al., 2021).

Важной задачей в области изучения гемопоэза является соотнесение молекулярного профиля индивидуальных клеток с функциональной активностью, в связи с чем применяют сочетанное использование различных модификаций методов РНК-секвенирования единичных клеток и трансплантационного анализа. Например, объединение функциональных анализов на уровне единичных клеток с разными подходами к сортировке и анализом экспрессии генов позволило разработать новую стратегию сортировки, надежно отличающую не-ГСК и ГСК и позволяющую успешно соотносить ключевые молекулы с их функциями в этих клетках (Wilson et al., 2015).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ГЕМОПОЭЗА

Использование новых высокотехнологичных методов анализа привело к уточнению многих положений бифуркационной модели и ее коррекции. Изменения касаются гетерогенности популяций ГСК, выявлению новых популяций коммитированных (частично коммитированных) предшественников, данных о возможности образования некоторых популяций клеток непосредственно из ГСК, минуя длинный путь дифференцировочной иерархии и др.

Гетерогенность ГСК и ГСПК

Детальные исследования ГСК привели к накоплению данных о гетерогенности данной популяции клеток. Вопрос о гетерогенности ГСК уже затрагивался нами при обсуждении двух популяций ГСК – LT-HSCs и ST-HSCs, различающихся по фенотипу и продолжительности восстановления ими кроветворения в летально облученных реципиентах (см. раздел “Основные свойства ГСК и представления об иерархической системе гемопоэза” и Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Passegue et al., 2005; Majeti et al., 2007; Challen et al., 2009; Notta et al., 2011). В начале 2000-х годов была определена еще одна популяция – IT-HSCs – клетки, обладающие ограниченной способностью к самообновлению, способные восстанавливать крове-

творение у реципиентов на “промежуточное” (между LT-HSCs и ST-HSCs) время и отличающиеся от LT-HSCs выраженной экспрессией CD49b (рис. 1-II, Benveniste et al., 2010; Ema et al., 2014).

Ключевым вопросом исследований последнего десятилетия стал вопрос о механизмах, определяющих путь клеточной дифференцировки и стадии, на которой определяется клеточное развитие. Исходно предполагалось, что все ГСК обладают сходным дифференцировочным потенциалом, и развитие клетки определяется на более поздней стадии клеточной дифференцировки. Однако исследования последних лет убедительно показали частичную прекоммитированность ГСК и их исходные различия по способности дифференцироваться преимущественно в миелоидном или лимфоидном направлениях.

Muller-Sieburg и соавторы (Muller-Sieburg et al., 2002) культивировали ГСК мыши в условиях лимитирующих разведений, трансплантировали полученные клетки с использованием конкурентного и серийного переносов и оценивали принадлежность потомков клеток донора к лимфоидным или миелоидным популяциям клеток. Авторам удалось показать, что компартменте ГСК присутствуют клетки, исходно частично прекоммитированные к дифференцировке преимущественно в лимфоидном направлении (Ly-bi, “lymphoid-biased”, лимфоид-смещенные или лимфоид-коммитированные), клетки, которые эффективно дифференцируются в миелоидном направлении (My-bi, “myeloid-biased”, миелоид-смещенные) и “сбалансированные” ГСК. При этом каждая субпопуляция самообновлялась с образованием “себе подобных” клеток, не давая другие типы (рис. 1-II, Muller-Sieburg et al., 2002; Muller-Sieburg et al., 2006). Dykstra и соавторы (рис. 1-II, Dykstra et al., 2007) трансплантировали единичные ГСК (клетки CD45midlin–Rho–Hoechst33342–) и клоны, полученные в результате их 4-дневного культивирования *in vitro*. Анализ лейкоцитов донорского происхождения в третьих реципиентах позволил авторам выделить 4 субпопуляции ГСК – α , β , γ и δ , обладающие способностью к длительной репопуляции. Было показано, что путь дифференцировки популяции β определяется до момента трансплантации, т.е. зависит не от внешних, а от “внутренних” факторов. Кроме того, серийные трансплантации продемонстрировали, что наибольшим миелоидным потенциалом и способностью к самообновлению обладают α клетки, а в ряду β , γ и δ снижается способность к самообновлению и происходит смещение от образования преимущественно миелоидных клеток (популяция β) к преимущественно лимфоидным клеткам (δ). Таким образом, авторы связали стадию активации ГСК с их дифференцировочным потенциалом. Близкая интерпретация следует и из других исследований. В частности, в работе Veerman и

соавторов (Beerman et al., 2010) было показано, что ГСК прекоммитированные к миелоидному направлению дифференцировки (My-biased, миелоид-уклоненные) имеют фенотип CD150⁺, а так называемые “сбалансированные” ГСК (обладающие одинаковым потенциалом к дифференцировке в миелоидном и лимфоидном направлениях) – фенотип CD150⁻.

Существование “смещенных по клонам” ГСК было показано не только на моделях с трансплантациями, т.е. в условиях экстренного гемопоэза, но и с применением технологии штрих-кодирования *in situ*, т.е. в условиях нативного гемопоэза (Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). Данные по трансплантациям единичных стволовых клеток показали, что субпопуляции, выделенные разными авторами в пределах компартмента ГСК, схожи. Так, α-HSCs во многом пересекаются с My-bi и LT-HSCs, β-HSCs – с Ba и IT-HSCs, а γ- и δ-HSCs – с Ly-bi HSCs и ST-HSCs (Morita et al., 2010; Ema et al., 2014).

Пересмотр основных точек бифуркации и модификации иерархической модели гемопоэза

Широкое распространение исследований на уровне единичных клеток привело к сомнениям в отношении предполагаемых в иерархической модели гемопоэза точек бифуркации, в том числе первой дивергенции на уровне общих миелоидных и общих лимфоидных предшественников (CMPs и CLPs).

При проведении клонального анализа одиночных LSK Flt3⁺ мыши было обнаружено, что эти клетки, обладая лимфоидным и миелоидным потенциалом, практически утрачивали способность к образованию мегакариоцитарных и эритроидных предшественников, в отличие от LSK Flt3⁻ (ГСК). Эти клетки с фенотипом CD34⁺ Flt3⁺ TpoR⁻/low EpoR-GSFR⁺ IL7Rα⁺ PU.1⁺ GATA1⁻ SCL^{low} были названы авторами LMPPs (лимфоид-праймированные мультипотентные предшественники). В данной модели обнаруженная гетерогенность ГСПК объясняется постепенной потерей клонального потенциала при их дифференцировке, что согласуется с классической моделью за исключением определения бифуркации уже на уровне ST-HSCs, а не MPPs (рис. 1-III, Adolfsson et al., 2005).

Последующие работы показывали расположение мегакариоцитарных и эритроидных предшественников в иерархии гораздо ближе к ГСК, чем это считалось ранее (Notta et al. 2016; Miyawaki et al., 2017). Так, исследования с применением технологии штрихкодирования ДНК показали, что общий эритро-миелоидный предшественник может быть обнаружен на уровне MPPs и тогда на этом уровне, а не на уровне CMP находится первая

точка бифуркации (Perie et al., 2015). При использовании метода парных дочерних клеток из ГСК костного мозга мышей с применением флуоресцентного красителя KuO, упомянутого ранее, и у первичных, и у вторичных реципиентов были получены клетки-предшественники MyRP (миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники), которые обладали способностью к долговременному восстановлению кроветворения, но с дифференцировочными потенциалами, ограниченными мегакариоцитарно-эритроидно-миелоидным направлением. MyRP давали начало репопулирующим предшественникам мегакариоцитов (MkRP), репопулирующим предшественникам миелоидных клеток (CMRP) и мегакариоцитарно-эритроидным репопулирующим предшественникам (MERP). Исходя из полученных авторами данных, можно предположить, что клонально-ограниченные клетки встречаются на самых ранних стадиях среди наиболее примитивных ГСК. Иерархическая модель гемопоэза при которой предполагается наличие среди ГСК длительно репопулирующих предшественников, способных продуцировать только миелоидные и эритроидные клетки по независимому, “обходному” пути, называется моделью “миелоидного обхода (шунтирования)” (рис. 1-III, Yamamoto et al., 2013).

В настоящее время признана гетерогенность популяции MPPs. Предлагается разделение популяции на MPP1, MPP2, MPP3 и MPP4. MPP1 сходны с IT- и ST-HSCs, способны к самообновлению и восстановлению кроветворения на срок около 4 месяцев после трансплантации и характеризуются фенотипом – LSK CD150⁺ Flk2⁻ CD48⁻. MPP2 (LSK CD150⁺ Flk2⁻ CD48⁺) и MPP3 (LSK CD150⁻ Flk2⁻ CD48⁺) демонстрируют смещенность в миелоидном направлении, при этом MPP2 больше в тромбоцитарном, а MPP4 (LSK CD150⁻ Flk2⁺ CD48⁺) – в лимфоидном. Предполагается, что все MPPs образуются из ГСК параллельно, но в разном количестве, в зависимости от условий и нужд кроветворной системы. Такая модель была названа “динамической моделью кроветворения” (рис. 1-III, Pietras et al., 2015).

Изменение взглядов на дискретность популяций

В 2015 г. было опубликовано крупномасштабное исследование кроветворных клеток с применением совокупности методов РНК-секвенирования на уровне единичной клетки, FACS проточной цитометрии, различных функциональных анализов, профилирования хроматина и компьютерного моделирования. В результате этого исследования была составлена карта динамических состояний транскрипции в основных популяциях

миелоидных предшественников, показано, что предполагаемые ранее дискретные группы предшественников, например СМР, содержат несколько отдельных групп клеток с разной степенью родства и обнаружены клеточные кластеры, не вписывающиеся в иерархическую модель гемопоэза (Paul et al., 2015). Данное исследование привело к появлению большого количества работ по изучению транскриптома единичных кроветворных клеток и реконструкции отношений между ними (Macauley et al., 2016; Velten et al., 2017; Karamitros et al., 2018; Dahlin et al., 2018). Был накоплен ряд данных об изменениях потенциала и фенотипа кроветворных клеток в зависимости от стадии клеточного цикла. Однако эксперименты с отсортированными по фазам клеточного цикла и трансплантированными клетками, показали, что 50% долгоживущих репопулирующих клеток находятся в S, G2 или даже M фазах клеточного цикла. Эксперименты с тимидином и бромдезоксипридином подтверждали, что большинство ГСК проходят S-фазу в течении 2 сут и при этом при трансплантации облученным животным часть этих клеток демонстрировала свойства LT-HSCs (Goldberg et al., 2014; Quesenberry et al., 2014). Результатом этих работ стала смена представлений о кроветворных предшественниках, как о наборе отдельных, фенотипически и функционально разделяемых популяций и предложена новая модель непрерывного гемопоэза. Согласно этой модели, гетерогенность ГСК является следствием не наличия разных субпопуляций в их составе, а постоянно меняющейся природой самих стволовых клеток (рис. 1-IV, Quesenberry et al., 2017). Переход через четкие мультипотентные и бипотентные стадии в этой модели отсутствует, как и четкая граница между стволовыми клетками и клетками-предшественниками. Клетки конкретной кроветворной линии непрерывно возникают непосредственно из континуума низкопраймированных недифференцированных кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников, называемых CLOUD-HSPCs (Velten et al., 2017; Cheng et al., 2020). Для наглядного представления современного взгляда на гемопоэз так же используют ландшафт Уоддингтона, где ГСК могут “выбирать” один из множества возможных маршрутов с помощью небольших различий в экспрессии генов, все больше склоняясь к определенному направлению, ведущему к одному из типов клеток (Velten et al., 2017).

Пересмотр взглядов на гемопоэз привел к поиску новых факторов и условий, определяющих выбор клетками дальнейшей судьбы и влияющих на состояние клеток в условиях стресса. Было показано, что ГСК, находящиеся на стадии G0 клеточного цикла, пребывают на разной “глубине” покоя. Это положение подтверждается различиями в экспрессии PAK4, CDK6 и CD112, определя-

ющих эпигенетические изменения и различные состояния G0, в ответ на стрессовые воздействия и наблюдениями после трансплантаций, которые показывают, что отдельные клоны ГСК начинают активироваться и участвовать в кроветворении после длительной латентной фазы в 1–2 года. Для выхода LT-ГСК из латентного состояния требуются сильные стрессовые стимулы, такие как вторичная трансплантация или действие 5-фторурацила (Kaufmann et al., 2021). Предполагают, что такие позже активирующиеся ГСК могут служить резервом при стрессе и резкой потере одного из типов кроветворных клеток (Haas et al., 2018).

ГСК экспрессируют цитокиновые рецепторы, связанные с кроветворением, такие, как рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), рецептор эритропоэтина (EpoR), рецепторная тирозинкиназа 3 класса (Flt3), рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), рецептор тромбопоэтина (TpoR). Было показано, что воздействие на ГСК M-CSF способствует индукции главного миелоидного регулятора PU.1 и направляет клетки по миелоидному пути (Mossadegh-Keller et al., 2013). Действие на мультипотентные предшественники лиганда Flt3 стимулирует их развитие по миелоидно-лимфоидному пути, подавляя образование мегакариоцитов и эритроидных предшественников (Tsarogas et al., 2014). А воздействие Epo на ГСК и мультипотентные предшественники сдвигает дифференцировку в эритроидном направлении (Grover et al., 2014). Повышающиеся в стрессовых условиях уровни цитокинов, могут влиять на клональный выход кроветворных клеток. Опираясь на результаты экспериментов с цитокинами и на данные о гетерогенности ГСК некоторые авторы предлагают модель “естественного отбора гемопоэза”. Согласно этой модели ГСК выбирают случайно один из возможных путей развития, далее дочерние клетки развиваются в направлении, к которому они “аффилированы”, выбирая “подходящую” по цитокинам нишу. При этом между цитокином и экспрессией его рецептора в клетках имеется положительная обратная связь, что еще больше “укрепляет” выбор (Brown et al., 2020).

По-видимому, гетерогенность ГСК определяется комбинацией внутренних (конфигурация хроматина, эпигенетические факторы) и внешних (определяемых преимущественно стромальными клетками и их продуктами, т.е. “нишей” кроветворных клеток) факторов. Установление причин гетерогенности должно быть предметом дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении многих лет общепринятой считалась иерархическая модель гемопоэза, согласно которой все многообразие клеток крови образуется из однотипных клеток предшественников – гемопоэтических стволовых клеток – в результате процесса их иерархической дифференцировки. Популяция ГСК представлялась как гомогенная популяция однотипных клеток, характеризующихся, с одной стороны, способностью длительное время находиться в покое, а с другой – способностью к самообновлению и дифференцировке. Гемопоэтическая дифференцировка рассматривалась как четко выстроенный процесс образования из ГСК дифференцированных унипотентных клеток, основанный на ступенчатых бифуркациях, каждая из которых постепенно сужает дальнейший дифференцировочный потенциал клетки, в конечном итоге приводя к образованию всего многообразия клеток крови. Основными положениями иерархической модели являются выделение дискретных относительно гомогенных популяций дифференцирующихся клеток и представление о строго упорядоченном характере перехода одной популяции клеток в другую.

Хотя иерархическая схема гемопоэза сохраняет свое значение и в наши дни, исследования последних лет внесли в нее значительные коррективы. Показано, что ГСК не являются гомогенной популяцией, а представляют собой гетерогенную совокупность клеток, различающихся между собой по экспрессии ряда поверхностных маркеров, “глубине” покоя и репопулирующей способности; выделены субпопуляции LT-HSCs, IT-HSCs, ST-HSCs, показана неоднородность каждой из них. Обнаружено, что уже на уровне ГСК имеет место частичная коммитированность клеток в миелоидном или лимфоидном направлении. Выделены новые субпопуляции мультипотентных предшественников (MMP2-4), описана ранее не включенная в схему популяция предшественников, способных дифференцироваться в лимфоидном и миелоидном, но не мегакариоцитарно-эритроидном направлении (LMPP). Описана возможность образования непосредственно из ГСК популяций предшественников, коммитированных в миелоидным или мегакариоцитарном направлении, сохраняющих репопулирующую способность. Продемонстрировано существование континуума дифференцировочных состояний ГСПК (в противовес четкому выделению отдельных популяций в классической иерархической модели гемопоэза). Совокупность полученных данных меняет устоявшиеся взгляды на гемопоэз и позволяет рассматривать его как процесс, происходящий в условиях динамического равновесия, чувствительный к факторам микроокружения, способный тонко, а не “скачкообразно”, реагировать на

изменения микроокружения. Эти представления важны для разработки методов получения и наращивания различных популяций гемопоэтических клеток с целью клинического применения, для выяснения механизмов и факторов, вызывающих гемопоэтические сдвиги в условиях патологии (например, при инфекционных заболеваниях), разработки методов коррекции гемопоэза при различных заболеваниях.

В настоящем обзоре нами были рассмотрены только основы современных представлений о кроветворении и методы, используемые при его изучении. В последние годы внимание исследователей преимущественно уделяется изучению молекулярных механизмов регуляции гемопоэза, включая механизмы поддержания ГСК в покое, инициации их дифференцировки, эпигенетической регуляции, отработке методов генетической коррекции и экспансии ГСК в условиях *in vitro*. Рассмотрение этих вопросов является предметом отдельного анализа и обобщения.

СОКРАЩЕНИЯ

BFU-E – erythroid burst-forming unit, взрывообразующая единица эритроцитов, ранний предшественник эритроидных клеток.

CAFC-assay – cobblestone area-forming cell assay, тест на клетки, образующие область булыжника.

CFU-E – erythroid colony-forming unit, колониеобразующая единица (унипотентный предшественник) эритроцитов.

CFU-G – granulocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (полипотентный предшественник) гранулоцитов.

CFU-GEMM – colony-forming unit – granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte, мультипотентный предшественник гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов.

CFU-GM – granulocyte-monocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (полипотентный предшественник) гранулоцитов и моноцитов.

CFU-M – monocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (унипотентный предшественник) моноцитов.

CMPs – common myeloid progenitors, общие миелоидные предшественники.

CMRP – репопулирующий предшественник миелоидных клеток.

CLPs – common lymphoid progenitors, общие лимфоидные предшественники.

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

IL3 – interleukin 3, интерлейкин 3.

IL6 – interleukin 6, интерлейкин 6.

LTC – long-term culture, длительные культуры.

LT-HSCs – long-term hematopoietic stem cells, длительно репопулирующие ГСК.

LTV-ICs – LTC-initiating cells, клетки, иницирующие длительные культуры.

LMPPs – lymphoid-primed multi-potential progenitors, лимфоид-праймированные мультипотентные предшественники.

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор.

MDA – multiple displacement amplification, множественная амплификация смещения.

MERP – мегакариоцитарно-эритроидный репопулирующий предшественник.

MPPs – multipotent progenitors, мультипотентные предшественники.

MkRP – репопулирующий предшественник мегакариоцитов.

MyRP – миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники.

NK – natural killer, естественные киллеры.

OMIP – optimized multicolor immunofluorescence panel, оптимизированная многоцветная иммуофлуоресцентная панель.

SCID – severe combined immunodeficiency, тяжелый комбинированный иммунодефицит.

EMP – erythro-myeloid progenitor, эритромиелоидный предшественник.

EPO – erythropoietin, эритропоэтин.

SCF – stem cell factor, фактор стволовых клеток.

ST-HSCs – short-term hematopoietic stem cells, коротко репопулирующие ГСК.

WGA – whole genome amplification, полногеномная амплификация.

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.

ГСПК – гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки.

АГМ – орто-гонадо-мезонефрос.

КОЕ-С – колониеобразующие единицы селезенки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2022 г. № 0088-2021-0016.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Васильева Т.В., Мичурина Т.В., Хрущев Н.Г. Иммунофлуоресцентное исследование происхождения клеток соединительной ткани у ксеногенных радиационных химер в норме и при асептическом воспалении // *Онтогенез*. 1978. Т. 9. № 3. С. 288–290.

Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре // *Онтогенез*. 2021. Т. 52. № 6. С. 429–440.

Терских В.В., Васильев А.В., Воротеляк Е.А. Поляризация и ассиметричное деление стволовых клеток // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 11. С. 933–938.

Adolfsson J., Mansson R., Buza-Vidas N. et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment // *Cell*. 2005. V. 121(2). P. 295–306.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.013>

Amarachintha S., Pang Q. Cobblestone area-forming cell assay of mouse bone marrow hematopoietic stem cells // *Bio Protoc*. 2018. V. 8(9). P. e2824.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2824>

Akala O.O., Park I.K., Qian D. et al. Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53^{-/-}p16Ink4a^{-/-}p19Arf^{-/-} multipotent progenitors // *Nature*. 2008. V. 453(7192). P. 228–232.

<https://doi.org/10.1038/nature06869>

Akashi K., Traver D., Miyamoto T. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages // *Nature*. 2000. V. 404(6774). P. 193–197.

<https://doi.org/10.1038/35004599>

Arakawa-Hoyt J., Dao M.A., Thiemann F. et al. The number and generative capacity of human B lymphocyte progenitors, measured in vitro and in vivo, is higher in umbilical cord blood than in adult or pediatric bone marrow // *Bone Marrow Transplant*. 1999. V. 24(11). P. 1167–1176.

<https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702048>

Beerman I., Bhattacharya D., Zandi S. et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107(12). P. 5465–5470.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1000834107>

Benveniste P., Frelin C., Janmohamed S. et al. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6(1). P. 48–58.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.014>

Boisset J.C., Cappellen W., Andrieu-Soler C. et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium // *Nature*. 2010. V. 464(7285). P. 116–120.

Bosma G.C., Custer R.P., Bosma M.J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse // *Nature*. 1983. V. 301(5900). P. 527–30.

<https://doi.org/10.1038/301527a0>

Bryder D., Rossi D.J., Weissman I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell // *Am. J. Pathol.* 2006. V. 169(2). P. 338–346.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>

- Brown G.* Towards a new understanding of decision-making by hematopoietic stem cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(7). P. 2362.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072362>
- Canete A., Carmona R., Ariza L. et al.* A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice // *Haematologica.* 2017. V. 102(4). P. 647–655.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.155812>
- Canu G., Ruhrberg C.* First blood: the endothelial origins of hematopoietic progenitors // *Angiogenesis.* 2021. V. 24(2). P. 199–211.
<https://doi.org/10.1007/s10456-021-09783-9>
- Carrelha J., Linc D.S., Rodriguez-Fraticellie A.E. et al.* Single-cell lineage tracing approaches in hematology research: technical considerations // *Experimental Hematology.* V. 9. P. 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.07.007>
- Carreras P., González I., Gallardo M. et al.* Long-term human hematopoietic stem cell culture in microdroplets // *Micromachines (Basel).* 2021. V. 12(1). P. 90.
<https://doi.org/10.3390/mi12010090>
- Challen G.A., Boles N.C., Chambers S.M.* Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGFβ1 // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6(3). P. 265–278.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.002>
- Challen G.A., Boles N., Lin K.K.Y. et al.* Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis // *Cytometry A.* 2009. V. 75(1). P. 14–24.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20674>
- Cheng H., Zheng Z., Cheng T.* New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation // *Protein Cell.* 2020. V. 11(1). P. 34–44.
<https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Dahlin J.S., Hamey F.K., Pijuan-Sala B. et al.* A single-cell hematopoietic landscape resolves 8 lineage trajectories and defects in Kit mutant mice // *Blood.* 2018. V. 131(21). P. e1–e11.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-821413>
- Dexter T.M., Lajtha L.G.* Proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro* // *Br. J. Haematol.* 1974. V. 28(4). P. 525–530.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb06671.x>
- Dick J.E., Bhatia M., Gan O. et al.* Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice // *Stem Cells.* 1997. V. 15. Suppl. 1. P. 199–203.
<https://doi.org/10.1002/stem.5530150826>
- Dimitris K., Stoilova B., Aboukhalil Z. et al.* Heterogeneity of human lympho-myeloid progenitors at the single cell level // *Nat Immunol.* 2018. V. 19(1). P. 85–97.
<https://doi.org/10.1038/s41590-017-0001-2>
- Dzierzak E., Bigas A.* Blood development: Hematopoietic stem cell dependence and independence // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22. № 5. P. 639–651.
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E. et al.* Hematopoiesis: a human perspective // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 10(2). P. 120–136.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dykstra B., Kent D., Bowie M. et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo* // *Cell Stem Cell.* 2007. V. 1(2). P. 218–229.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015>
- Eich M., Trumpp A., Schmitt S.* OMIP-059: Identification of mouse hematopoietic stem and progenitor cells with simultaneous detection of CD45.1/2 and controllable green fluorescent protein expression by a single staining panel // *Cytometry A.* 2019. V. 95(10). P. 1049–1052.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23845>
- Ema H., Nakauchi H.* Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo // *Blood.* 2000. V. 95(7). P. 2284–2288. PMID: 10733497.
- Ema H., Morita Y., Suda T.* Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* 2014. V. 42(2). P. 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.11.004>
- Frascoli M., Proietti M., Grassi F.* Phenotypic analysis and isolation of murine hematopoietic stem cells and lineage-committed progenitors // *J. Vis. Exp.* 2012. V. 65. P. 3736.
<https://doi.org/10.3791/3736>
- Fraser C.C., Kaneshima H., Hanstee G.* Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft // *Blood.* 1995. V. 86(5). P. 1680–1693. PMID: 7655000.
- Forraz N., Pettengell R., McGuckin C.P.* Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for LTC-IC // *Stem Cells.* 2004. V. 22(1). P. 100–108.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.22-1-100>
- Gekas C., Dieterlen-Lièvre F., Orkin S.H. et al.* The placenta is a niche for hematopoietic stem cells // *Dev. Cell.* 2005. V. 8(3). P. 365–375.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.016>
- Gerrits A., Dykstra B., Kalmykova O.J. et al.* Cellular barcoding tool for clonal analysis in the hematopoietic system // *Blood.* 2010. V. 115(13). P. 2610–2618.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-229757>
- Giebel B., Punzel M.* Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells // *Biol. Chem.* 2008. V. 389(7). P. 813–824.
<https://doi.org/10.1515/BC.2008.092>
- Godin I., Garcia-Porrero J.A., Dieterlen-Lièvre F. et al.* Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites // *J. Exp. Med.* 1999. V. 190(1). P. 43–52.
<https://doi.org/10.1084/jem.190.1.43>
- Goldberg L.R., Dooner M.S., Johnson K.W. et al.* The murine long-term multi-lineage renewal marrow stem cell is a cycling cell // *Leukemia.* 2014. V. 28(4). P. 813–822.
<https://doi.org/10.1038/leu.2013.252>
- Gordon M.Y.* Human haemopoietic stem cell assays // *Blood Rev.* 1993. V. 7(3). P. 190–197.
[https://doi.org/10.1016/0268-960x\(93\)90005-o](https://doi.org/10.1016/0268-960x(93)90005-o)
- Grover A., Mancini E., Moore S. et al.* Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211(2). P. 181–188.
<https://doi.org/10.1084/jem.20131189>
- Haas S., Trumpp A., Milsom M.D.* Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22(5). P. 627–638.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003>
- Hou S., Li Z., Zheng X.* Embryonic endothelial evolution towards first hematopoietic stem cells revealed by single-cell transcriptomic and functional analyses // *Cell Res.*

2020. V. 30(5). P. 376–392.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0300-2>
- Husa A.M., Strobl M.R., Strajeriu A. et al. Generation of CD34 fluorescent reporter human induced pluripotent stem cells for monitoring hematopoietic differentiation // *Stem Cells Dev.* 2018. V. 27(19). P. 1376–1384.
<https://doi.org/10.1089/scd.2018.0093>
- Ishikawa F., Niuro H., Iino T. et al. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways // *Blood.* 2007. V. 110(10). P. 3591–3660.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-071613>
- Ito M., Kobayashi K., Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 324. P. 53–76.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-75647-7_3
- Itoh K., Tezuka H., Sakoda H. et al. Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow // *Exp Hematol.* 1989. V. 17(2). P. 145–153. PMID: 2783573.
- Ivanovs A., Rybtsov S., Welch L. et al. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208(12). P. 2417–2427.
<https://doi.org/10.1084/jem.20111688>
- Kadereit S., Deeds L.S., Haynesworth S.E. et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer // *Stem. Cells.* 2002. V. 20(6). P. 573–582.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-573>
- Karamitros D., Stoilova B., Aboukhalil Z. et al. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19(1). P. 85–97.
<https://doi.org/10.1038/s41590-017-0001-2>
- Kaufmann K.B., Zeng A.G.X., Coyaud E. et al. A latent subset of human hematopoietic stem cells resists regenerative stress to preserve stemness // *Nat. Immunol.* 2021. V. 22(6). P. 723–734.
<https://doi.org/10.1038/s41590-021-00925-1>
- Kennedy M., D'Souza S.L., Lynch-Kattman M. et al. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures // *Blood.* 2007. V. 109(7). P. 2679–2687.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047704>
- Kent D.G., Li J., Tanna H. et al. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion // *PLoS Biol.* 2013. V. 11(6). P. e1001576.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001576>
- Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells // *Comparative Study Cell.* 2005. V. 121(7). P. 1109–1121.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026>
- Koller M.R., Manchel I., Maher R.J. et al. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system // *Bone Marrow Transplant.* 1998. V. 21(7). P. 653–663.
- Kondo M., Weissman I.L., Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow // *Cell.* 1997. V. 91(5). P. 661–672.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80453-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80453-5)
- Kronstein-Wiedemann R., Tonn T. Colony formation: an assay of hematopoietic progenitor cells // *Methods. Mol. Biol.* 2019. V. 2017. P. 29–40.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9574-5_3
- Lacaud G., Kouskoff V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis // *Experimental Hematology.* 2017. V. 49. P. 19–24.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.12.009>
- Lange L., Morgan M., Schambach A. The hemogenic endothelium: a critical source for the generation of PSC-derived hematopoietic stem and progenitor cells // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78(9). P. 4143–4160.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03777-y>
- Lee J., Hyeon D.Y., Hwang D. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods // *Exp. Mol. Med.* 2020. V. 52(9). P. 1428–1442.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0420-2>
- Li Z., Lan Y., He W. et al. Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development // *Cell Stem. Cell.* 2012. V. 11(5). P. 663–675.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.004>
- Macaulay I.C., Svensson V., Labalette C. et al. Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells // *Cell Rep.* 2016. V. 14(4). P. 966–977.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.082>
- Majeti R., Park C.Y., Weissman I.L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood // *Cell Stem. Cell.* 2007. V. 1(6). P. 635–645.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>
- Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E. et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages // *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 2000. V. 9(6). P. 841–848.
- Marella F., de Bruijn T.R., Speck N.A. et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo // *EMBO J.* 2000. V. 19(11). P. 2465–2474.
- Maximow A.A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium // *Physiol. Rev.* 1924. V. 4. P. 533–540.
- Mayle A., Luo M., Jeong M. et al. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells // *Cytometry A.* 2013. V. 83(1). P. 27–37.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22093>
- Mazo I.B., Massberg S., von Andrian U.H. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking // *Trends Immunol.* 2011. V. 32(10). P. 493–503.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.011>
- McGrath K.E., Frame J.M., Palis J. Early hematopoiesis and macrophage development // *Semin. Immunol.* 2015. V. 27(6). P. 379–387.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.013>
- McNiece I., Andrews R., Stewart M. et al. Action of interleukin-3, G-CSF, and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF // *Blood.* 1989. V. 74(1). P. 110–114. PMID: 2473792.

- Medvinsky A., Rytsov S., Taoudi S.* Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions // *Development*. 2011. V. 138(6). P. 1017–1031. <https://doi.org/10.1242/dev.040998>
- Miyawaki K., Iwasaki H., Jiromaru T. et al.* Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis // *Blood*. 2017. V. 129(25). P. 3332–3343. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741611>
- Mossadegh-Keller N., Sarrazin S., Kandalla P.K. et al.* M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells // *Nature*. 2013. V. 497(7448). P. 239–243. <https://doi.org/10.1038/nature12026>
- Morita Y., Ema H., Nakauchi H.* Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207(6). P. 1173–1182. <https://doi.org/10.1084/jem.20091318>
- Morrison S.J., Weissman I.L.* The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype // *Immunity*. 1994. V. 1(8). P. 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-x)
- Muller-Sieburg C.E., Cho R.H., Thoman M. et al.* Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation // *Blood*. 2002. V. 100(4). P. 1302–1309. PMID: 12149211.
- Muller-Sieburg C.E., Sieburg H.B.* Clonal diversity of the stem cell compartment // *Curr. Opin. Hematol.* 2006. V. 13(4). P. 243–248. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000231421.00407.65>
- Nishikawa E., Matsumoto T., Isige M.* Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord // *Regen Ther.* 2016. V. 4. P. 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2015.12.002>
- Notta F., Doulatov S., Laurenti E. et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment // *Science*. 2011. V. 333(6039). P. 218–221. <https://doi.org/10.1126/science.1201219>
- Notta F., Zandi S., Takayama N. et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny // *Science*. 2016. V. 351(6269): aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>
- Norhaiza H.S., Rohaya M., Zarina Z.* *In vitro* expansion of Lin⁺ and Lin[–] mononuclear cells from human peripheral blood // *AIP Conference Proceedings*. 2013. V. 1571. P. 238. <https://doi.org/10.1063/1.4858661>
- Oguro H., Ding L., Morrison S.J.* SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors // *Cell Stem. Cell*. 2013. V. 13(1). P. 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.014>
- Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K. et al.* *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells // *Blood*. 1992. V. 80(12). P. 3044–3050. PMID: 1281687.
- Osawa M., Hanada K., Hamada H.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell // *Science*. 1996. V. 273(5272). P. 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>
- Palis J., Yoder M.C.* Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man // *Review Exp. Hematol.* 2001. V. 29(8). P. 927–936. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(01\)00669-5](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00669-5)
- Passegue E., Wagers A.J., Giuriato S. et al.* Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202(11). P. 1599–1611. <https://doi.org/10.1084/jem.20050967>
- Paul F., Arkin Y., Giladi A. et al.* Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors // *Cell*. 2015. V. 163(7). P. 1663–1677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.013>
- Pearson T., Greiner D.L., Shultz L.D.* Humanized SCID mouse models for biomedical research // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 324. P. 53–76. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75647-7_3
- Pereira C., Clarke E., Damen J.* Hematopoietic colony-forming cell assays // *Methods. Mol. Biol.* 2007. V. 407. P. 177–208. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-536-7_14
- Perie L., Duffy K.R., Kok L. et al.* The branching point in erythro-myeloid differentiation // *Cell*. 2015. V. 163(7). P. 1655–1662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.059>
- Pessina A., Albella B., Bayo M. et al.* Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics // *Toxicol. Sci.* 2003. V. 75(2). P. 355–367. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg188>
- Pessina A., Malerba I., Gribaldo L.* Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and pre-clinical trials // *Curr. Pharm. Des.* 2005. V. 11(8). P. 1055–1065. <https://doi.org/10.2174/1381612053381648>
- Pham T., Tyagi A., Wang Y.S. et al.* Single-cell proteomic analysis // *WIREs Mech. Dis.* 2021. V. 13(1). P. e1503. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1503>
- Pietras E.M., Reynaud D., Kang Y.A. et al.* Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions // *Cell Stem. Cell*. 2015. V. 17(1). P. 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Pike B.L., Robinson W.A.* Human bone marrow colony growth in agar-gel // *J. Cell. Physiol.* 1970. V. 76(1). P. 77–84. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040760111>
- Quesenberry P.J., Goldberg L., Aliotta J. et al.* Marrow hematopoietic stem cells revisited: they exist in a continuum and are not defined by standard purification approaches; then there are the microvesicles // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 56. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00056>
- Quesenberry P., Goldberg L., Dooner M. et al.* Hematopoietic Stem Cells: Uncomfortable Considerations // *Curr. Mol. Biol. Rep.* 2017. V. 3(3). P. 165–171. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0068-4>
- Reitsma M.J., Lee B.R., Uchida N.* Method for purification of human hematopoietic stem cells by flow cytometry //

- Methods. Mol. Med. 2002. V. 63. P. 59–77.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-140-X:059>
- Rodriguez-Fraticelli A.E., Camargo F. Systems analysis of hematopoiesis using single-cell lineage tracing // Curr. Opin. Hematol. 2021. V. 28(1). P. 18–27.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000624>
- Rodriguez-Fraticelli A., Wolock S.L., Weinreb C.S. et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis // Nature. 2018. V. 553(7687). P. 212–216.
<https://doi.org/10.1038/nature25168>
- Ruiz J.P., Chen G., Mora J.J.H. et al. Robust generation of erythroid and multilineage hematopoietic progenitors from human iPSCs using a scalable monolayer culture system // Stem Cell Res. 2019. V. 41. P. 101600.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101600>
- Sagoo P., Gaspar H.B. The transformative potential of HSC gene therapy as a genetic medicine // Gene Ther. 2021. Online ahead of print.
<https://doi.org/10.1038/s41434-021-00261-x>
- Sanjuan-Pla A., Macaulay I.C., Jensen C.T. et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy // Nature. 2013. V. 502. P. 232–236.
<https://doi.org/10.1038/nature12495>
- Sawai C.M., Babovic S., Upadhaya S. et al. Hematopoietic stem cells are the major source of multilineage hematopoiesis in adult animals // Immunity. 2016. V. 45(3). P. 597–609.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.007>
- Shan L., Flavell R.A., Herndler-Brandstetter D. Development of humanized mouse models for studying human NK cells in health and disease // Methods. Mol. Biol. 2022. V. 2463. P. 53–66.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2160-8_5
- Shultz L.D., Lyons B.L., Burzenski L.M. et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 6477–6489.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
- Sender R., Milo R. The distribution of cellular turnover in the human body // Nat. Med. 2021. V. 27(1). P. 45–48.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-01182-9>
- Slovin S., Carissimo A., Panariello F. Single-Cell RNA sequencing analysis: a step-by-step overview // Methods. Mol. Biol. 2021. V. 2284. P. 343–365.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_19
- Sumide K., Matsuoka Y., Kawamura H. A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells // Nature Communications. 2018. V. 9. P. 2202.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04441-z>
- Sun J., Ramos A., Chapman B. et al. Clonal dynamics of native haematopoiesis // Nature. 2014. V. 514(7522). P. 322–327.
<https://doi.org/10.1038/nature13824>
- Theocharides A., Rongvaux A., Kristin F. et al. Humanized hemato-lymphoid system mice // Haematologica. 2016. V. 101(1). P. 5–19.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2014.115212>
- Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat Res. 1961. V. 14. P. 213–222. PMID: 13776896.
- Tsapogas P., Swee K.L., Nusser A. et al. In vivo evidence for an instructive role of fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) ligand in hematopoietic development // Haematologica. 2014. V. 99(4). P. 638–646.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2013.089482>
- Velier M., Chateau A.L., Malenfant C. et al. Validation of a semi automatic device to standardize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cell products // Cytotherapy. 2019. V. 21(8). P. 820–823.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.06.005>
- Velten L., Haas S.F., Raffel S. et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process // Nat. Cell. Biol. 2017. V. 19(4). P. 271–281.
<https://doi.org/10.1038/ncb3493>
- Wilkinson A.C., Igarashi K.J., Nakauchi H. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo // Nat. Rev. Genet. 2020. V. 21(9). P. 541–554.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0241-0>
- Willinger T., Rongvaux A., Strowig T. Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement // Trends. Immunol. 2011. V. 32(7). P. 321–327.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.005>
- Wilson N., Kent D.G., Buettner F. Combined single-cell functional and gene expression analysis resolves heterogeneity within stem cell populations // 2015. Cell Stem. Cell. V. 16(6). P. 712–724.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.004>
- Wittamer V., Bertrand J.Y. Yolk sac hematopoiesis: does it contribute to the adult hematopoietic system? // Cell Mol. Life Sci. 2020. V. 77(20). P. 4081–4091.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03527-6>
- Yamamoto R., Morita Y., Ooehara J. et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells // Cell. 2013. V. 154(5). P. 1112–1126.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007>
- Yang L., Bryder D., Adolfsson J. et al. Identification of Lin(–) Sca1(+) kit(+) CD34(+) Flt3– short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients // Blood. 2005. V. 105(7). P. 2717–2723.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2159>
- Zhao X., Gao S., Kajigaya S. et al. Comprehensive analysis of single-cell RNA sequencing data from healthy human marrow hematopoietic cells // BMC Res. Notes. 2020. V. 13(1). P. 514.
<https://doi.org/10.1186/s13104-020-05357-y>
- Zhang P., Li X., Pan C. et al. Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity // Stem. Cell Res. Ther. 2022. V. 13(1). P. 39.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02718-1>
- Zovein A.C., Hofmann J.J., Lynch M. et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells // Cell Stem. Cell. 2008. V. 3(6). P. 625–636.

Hematopoietic Stem Cell and Initial Stages of Hemopoiesis: Research Methods and Modern Concepts

O. N. Sheveleva¹, * and I. V. Lyadova¹

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

**e-mail: on_sheveleva@mail.ru*

Hematopoietic stem cells (HSCs) have long been one of the most well-studied type of stem cells. Multiple experimental and clinical studies allowed to characterize the main HSC properties, elaborate methodological approaches for their analyses and ultimately led to the formulation of hierarchical theory of hematopoiesis. According to the hierarchical theory, HSCs stand at the root of the hematopoietic tree and are characterized by high self-renewal and multipotent differentiation capacities. Following the differentiation, HSC successively give rise to diverse hematopoietic precursors that ultimately produce the whole variety of differentiated blood cells. The concept on the strict sequence of HSC differentiation has recently changed, largely, due to the development and implementation of new hi-tech methods of cell differentiation analysis. This review summarizes classical views on HSC biology and early stages of their differentiation, outlines main methodological approaches used in HSC studies and discusses recent achievements and modern views on the early stages of hematopoiesis.

Keywords: hematopoietic stem cells, hematopoiesis, heterogeneity, hierarchy

КРИТИЧЕСКИЕ СТАДИИ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЗЛАКОВ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

© 2022 г. Н. Н. Круглова^{а, *}, Г. Е. Титова^б, А. Е. Зинатуллина^а

^аУфимский институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

^бБотанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 12.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Проблема критических периодов/стадий эмбриогенеза цветковых растений детально разработана с позиции системного подхода к дифференциации зародыша, учитывающим значение морфогенетических и морфофизиологических корреляций для развития эмбриональных структур и окружающих тканей семени и плода (цикл работ Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой, 1983–2014). Особый интерес вызывают критические стадии эмбриогенеза злаков, поскольку зародыш представителей этого семейства выделяется среди зародышей даже однодольных растений особым Graminad-типом эмбриогенеза и формированием специфических органов (Т.Б. Батыгина, 1968–2014). В статье на примере злаков приведен аналитический обзор литературных и собственных данных по периодизации многоступенчатого процесса эмбриогенеза, проанализированы дискуссионные вопросы, касающиеся как критериев выделения критических стадий эмбриогенеза, так и особенностей критических стадий. Обсуждаются перспективы исследования стадийности эмбриогенеза злаков, а также использования зародышей, находящихся на критических стадиях развития, в биотехнологических и селекционных исследованиях.

Ключевые слова: зародыш, эмбриогенез, критические стадии развития, культурные злаки

DOI: 10.31857/S0475145022060040

ВВЕДЕНИЕ

Зиготический эмбриогенез цветковых растений представляет собой единый многоступенчатый процесс, в результате которого из исходной клетки-зиготы, согласно определенным паттернам клеточных делений, в зрелом семени формируется зародыш со свойственными ему специфическими органами (Эмбриология цветковых..., 1997, 2000; Батыгина, 2014; de Vries, Weijers, 2017; Chen et al., 2021). Сложный интегративный характер эмбриогенеза растений подтверждается данными молекулярно-генетических исследований (Armenta-Medina et al., 2020; Tian et al 2020; Rabon-Mora et al., 2022).

Стадии эмбриогенеза цветковых растений выделяются на основании анализа основных морфогенетических событий, их значения для дальнейшего развития зародыша, а также структурно-функциональных изменений в клетках и органах зародыша под действием генетических, физиологических и иных факторов. Ряд исследователей

расценивают некоторые стадии как критические, однако при этом используют различные критерии. Это и независимость зародыша от материнского организма (автономность), и повышенная чувствительность зародыша к воздействию внешних неблагоприятных факторов, и способность зародыша к смене программы развития на альтернативные пути.

Важно подчеркнуть, что и в эмбриогенезе животных критические стадии предложено выделять с позиции повышенной чувствительности эмбриона к неблагоприятным факторам внешней среды. Еще в конце XIX в. А. Вейсман и М.-Р. Штандфус в работах, посвященных изучению повреждающих внешних факторов на развитие некоторых насекомых, выявили, что в их эмбриогенезе имеются периоды развития, характеризующиеся особой чувствительностью к этим факторам (Weismann, 1894; Standfuss, 1896, по: Severtsova, Severtsov, 2011). Такие периоды повышенной чувствительности, во время которых происходит нарушение

темпов развития отдельных органов эмбриона, позднее были названы “критическими” (Светлов, 1960 и др.). В современной эмбриологии животных большое внимание уделяется “филотипическим” стадиями развития, которые, по-видимому, соответствуют критическим периодам Светлова (Richardson, 1995, по: Severtsova, Severtsov, 2013). На этих стадиях животные, входящие в филогенетическую группу, демонстрируют наибольшее морфологическое сходство, и именно с ними ассоциирована экспрессия целого ряда генов, определяющих план строения группы. Серьезные аномалии развития также преимущественно возникают на этих стадиях. Разрабатываются эволюционные гипотезы, объясняющие возникновение критических периодов и филотипических стадий развития в эмбриогенезе животных (случайные процессы, эпигенетические процессы, стабилизирующий отбор), предлагаются модели этого феномена (“hour-glass model”, “phylotypic egg-timer model”) (по: Severtsova, Severtsov, 2013). Высказано мнение, что определенные критические фазы существуют и в процессе регенерации животных (Lange et al., 2018).

Таким образом, выявление критических стадий эмбриогенеза различных организмов следует рассматривать как фундаментальную проблему биологии развития.

Значительный вклад в решение этой проблемы внесли Т.Б. Батыгина и В.Е. Васильева (цикл работ 1983–2014). Они применили системный подход к изучению дифференциации зародыша цветковых растений, который базируется на использовании морфогенетических и морфофизиологических корреляций в развитии не только эмбриональных структур, но и окружающих тканей семени и плода. Этот подход далее был детально разработан в работах И.И. Шамрова с соавторами (обобщение: Шамров, 2008) по развитию семязачатка и семени цветковых растений. Кроме того, он был применен в экспериментальных исследованиях по культивированию *in vitro* пыльников пшеницы (обобщения: Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Круглова, 2019). Использование системного подхода позволило выявить критические стадии развития семязачатка и пыльника, что важно как для понимания общих закономерностей морфогенеза этих структур, так и для биотехнологии.

С этих позиций особый интерес вызывают критические стадии эмбриогенеза злаков. Действительно, представители семейства злаковых характеризуются спецификой прохождения ранних этапов развития зародыша, его строения в зрелом семени и контакта с тканью эндосперма (обобщения: Батыгина, 1997а, 2014), что позволило выделить отдельный Graminad-тип эмбриогенеза (обобщения: Батыгина, 1997б, 2014). Выявление критических стадий эмбриогенеза злаков имеет

значение не только для понимания механизмов развития их зародыша, но и для решения ряда теоретических проблем, в частности, для разработки некоторых вопросов систематики и филогении цветковых растений (Цвелёв, 2005; Batygina, 2012; Radoeva et al., 2019; Baskin, Baskin, 2021). Практический интерес к этому вопросу обусловлен бурным ростом биотехнологических исследований хлебных злаков (по: Kругlova, Zinatullina, 2022).

Ранее авторами этой статьи был выполнен обзор данных литературы и собственных исследований, посвященных выявлению и характеристике критической стадии автономности эмбриогенеза злаков (Kругlova et al., 2020b). Цель настоящей работы состоит в аналитическом обзоре данных, связанных с выявлением других возможных критических стадий эмбриогенеза злаков, а также с применением этих данных в биотехнологической практике (в свете развития представлений чл.-корр. РАН Т.Б. Батыгиной по этому вопросу).

КРИТИЧЕСКИЕ СТАДИИ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЗЛАКОВ

Структурно-функциональные особенности развивающихся зародышей злаков

Одной из первых обстоятельных работ по эмбриогенезу злаков является работа Р. Суэжа (Souèges, 1924), в которой автор на основании анализа паттернов клеточных делений в ходе ранних стадий развития зародыша у *Poa annua* сделал вывод об отсутствии в них четких закономерностей (иррегулярный тип эмбриогенеза).

Позднее эмбриогенез злаков детальнейшим образом был изучен на примере пшеницы, в том числе с использованием 3D-реконструкций (обобщения: Батыгина, 1997а, 1997б; 2014). Выявлено, что зигота характеризуется полярностью и дорсовентральностью строения: первая проявляется в наличии в клетке морфологической оси с двумя противоположными полюсами (апикальным и базальным), вторая – в асимметрии ее строения. Дорсовентральность строения усиливается в ходе дальнейшего развития зародыша, получая все более яркое морфологическое выражение. Как правило, через сутки после сингамии зигота приступает к первому делению, асимметричному вследствие полярности этой клетки (рис. 1, 1), с образованием двух неравных клеток: меньшей апикальной и более крупной и сильновакуолизированной базальной (рис. 1, 2). В результате серии дальнейших асимметричных делений апикальной и базальной клеток и их производных (рис. 1, 2–8) формируется многоклеточный проэмбрио (рис. 1, 8). Далее в многоклеточном зародыше следуют дифференциация инициальных клеток тканей и органов, формирование зачатков органов и их дифференциация.

Разрастание апикально-латеральной области приводит к образованию первого органа – щитка (рис. 1, 9–13). В ходе сложных преобразований щиток смещается из латерального в терминальное положение, свойственное зрелому зародышу. В основании щитка дифференцируется прокамбиальный тяж. После начала разрастания щитка наблюдается увеличение количества митотически делящихся клеток в зоне образования апекса побега, который закладывается терминально, но постепенно смещается в боковое положение (рис. 1, 14). Дальнейшее развитие этой области приводит к обособлению колеоптиля и точки роста почечки (плюмулы) (рис. 1, 15). Заложение колеоптиля и дифференциация прокамбиального тяжа в основании щитка совпадают по времени с началом образования первого зародышевого корня эндогенно в базальной части зародыша (рис. 1, 15–16). Корневой чехлик и колеориза (корневое влагалище) возникают и развиваются как единое образование, но по завершении эмбриогенеза колеориза постепенно обособляется от чехлика (рис. 1, 15–19). Эпибласт дифференцируется позднее (рис. 1, 16) и располагается на стороне, противоположной щитку, образуя чешуевидный вырост, лишенной проводящей системы (рис. 1, 17–19).

На апексе побега постепенно формируются зачатки листьев, закладывающиеся валиком; в результате образуется зародышевая почечка (плюмула) (рис. 1, 15). Зачаточный побег зародыша представляет собой ось, состоящую из узлов и междоузлий, и в зрелом зародыше содержит несколько зачатков листьев (рис. 1, 19).

В целом, в ходе эмбриогенеза в результате множественных делений определенных кластеров клеток формируются органы зародыша пшеницы: щиток (с выделяющейся на верхушке лигулой), эпибласт, колеоптиль, колеориза, плюмула (почечка, представленная несколькими примордиями листьев) и корень (рис. 1, 19). Согласно обобщениям Т.Б. Батыгиной, основанным на анализе данных других авторов (Яковлев, 1946, 1950; Brown, 1959, 1960, 1965; Guignard, 1961; Соколовская, 1968; Чеботарь, 1972; Russell, 1979, приведено по: Батыгина, 1997а), эти органы характерны для зародышей большинства других злаков. Выявлено лишь варьирование в числе зачатков листьев на апексе побега зародыша (от 2 до 4), а также отсутствие эпибласта в зародыше кукурузы (присутствует в зародышах пшеницы, ржи, ячменя и овса).

Благодаря анализу данных многих авторов (Eames, 1959, 1961; Guignard, Menstre, 1971; Norstog, 1972; Stoddart et al., 1973; приведено по: Батыгина, 1997а; а также Itoh et al., 2005; Seldimirova et al., 2017b; Xiang et al., 2019; Baskin, Baskin, 2021) удалось выявить следующие функции органов зародыша злаков, уникальных даже среди однодольных. Роль эпибласта состоит в установлении связи

зародыша с эндоспермом (резорбция прилегающих клеток эндосперма и поглощение из него питательных веществ), а также транспорте воды к зародышу воды при прорастании. Главной функцией колеоптиля является защита конуса нарастания при “пробивании” почвы прорастающей зерновкой (у некоторых видов злаков может выполнять фотосинтетическую функцию). Функция колеоризы – защита зародышевого корня и, вероятно, поставка воды и питательных веществ при прорастании.

Анализ специфических особенностей эмбриогенеза пшеницы (дорсовентральность строения зародыша, начиная с зиготы, проявляющаяся в закономерном наклонном заложении клеточных перегородок по отношению к оси проэмбрио, раннее обособление щитка, наличие специфических органов, присущих только зрелому зародышу злаков) позволил Т.Б. Батыгиной выделить особый тип эмбриогенеза злаков – Craminad-тип¹ (обобщения: Батыгина, 1997б, 2014).

Следует также подчеркнуть, что Т.Б. Батыгина впервые рассмотрела зародыш злаков как единую систему “яйцеклетка–зигота–зародыш–проросток”, развивающуюся в материнских тканях семязачатка и зародышевого мешка, и внесла значительный вклад в понимание вопроса о специфической топографии его органов. В частности, она доказала, что латеральное положение апекса побега и терминальное положение щитка в зрелом зародыше злаков – явление вторичное как в онтогенетическом, так и эволюционном плане. Здесь имеется в виду отсутствие принципиальных различий в происхождении точки роста побега в зародыше двудольных и однодольных растений. Также ею высказано мнение, что щиток, колеориза и эпибласт являются производными единственной семядоли зародыша, приобретшими в процессе эволюции различные функции (Батыгина, 1997а). Следует, однако, отметить, что вопрос об эволюционном происхождении органов зародыша злаков до сих пор остается дискуссионным, и его рассмотрение не входит в задачи данной статьи.

Безусловно, исследования эмбриогенеза злаков с различных позиций проводились и в последующие годы (по: Kruglova et al., 2020а; Baskin, Baskin, 2021). Современные исследования в основном ориентированы на выявление и анализ генов, вовлеченных в последовательные стадии развития зародышей злаков. Так, молекулярно-генетические данные по раннему эмбриогенезу

¹ Вопрос о выделении эмбриогенеза злаков в отдельный Graminad- (Poad-) тип заслуживает специального внимания: несмотря на широкое признание данного типа эмбриогенеза в русскоязычной литературе (см. Эмбриология цветковых..., 1997, 2000), в современной англоязычной литературе его, как правило, относят к Asterad-типу Poa-вариации, по классификации Д. Джохансена (Johansen, 1950) (см., например, Baskin, Baskin, 2021).

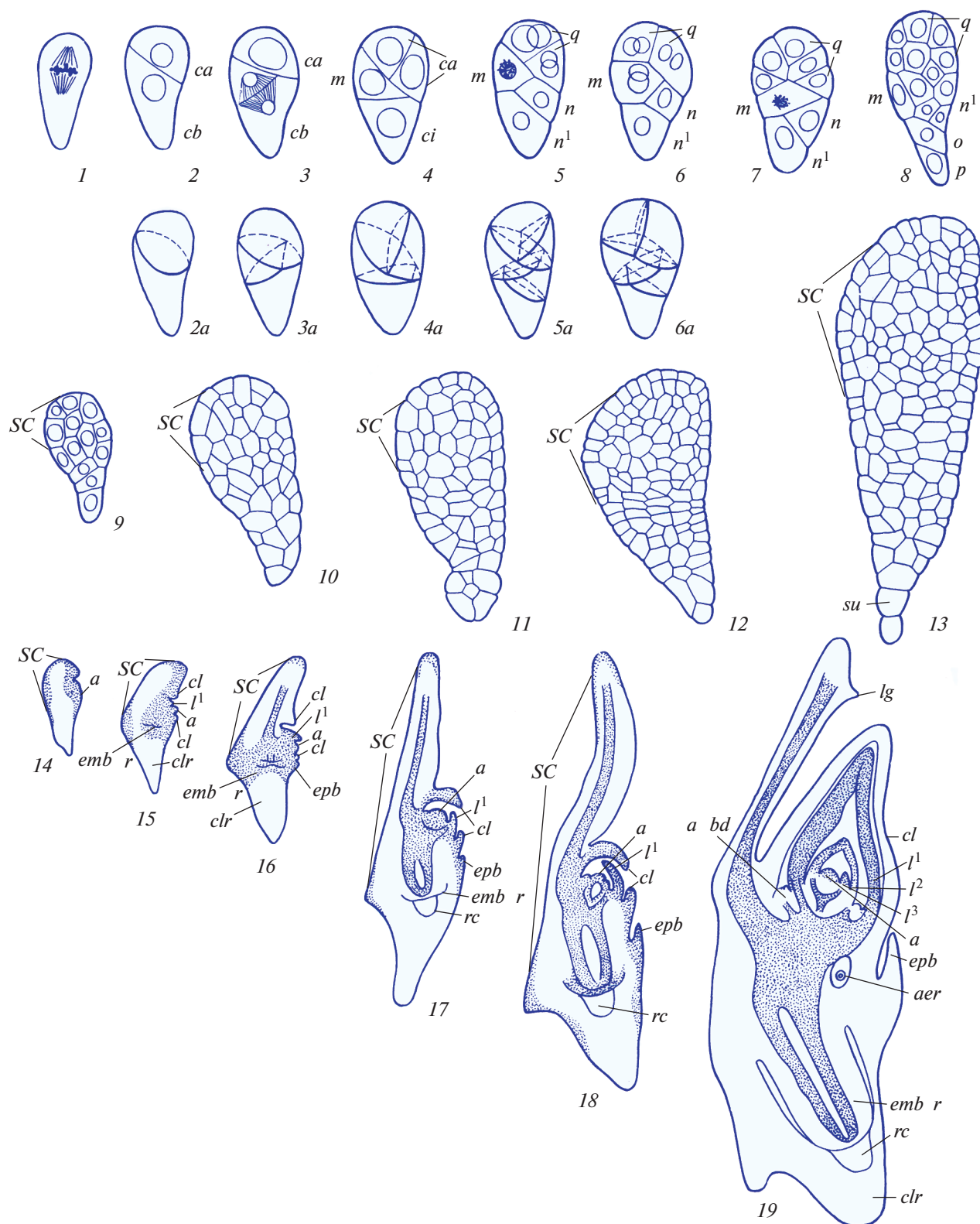


Рис. 1. Схема развития зародыша пшеницы согласно Graminad-типу эмбриогенеза. 1–19 – схема строения зародыша в дорсовентральном сечении; 2a–6a – стереоскопическая схема строения зародыша. Условные обозначения: *a* – апекс; *abd* – пазушная почка; *aer* – придаточный зародышевый корень; *cl* – колеоптиль; *clr* – колеориза; *em* – зародыш; *emb r* – зародышевый корень; *epb* – эпибласт; *l¹*, *l²*, *l³* – первые листья плюмулы; *lg* – лигула; *rc* – корневой чехлик; *sc* – щиток; *su* – суспензор. По: Батыгина, 2014, с изменениями. Пояснения в тексте.

кукурузы используются для решения вопроса об активации зиготического генома растений (“zygotic genome activation”, или ZGA). Используя зародыши кукурузы в качестве модельной системы, исследователи провели секвенирование РНК гамет, зиготы, апикальной и базальной клеток двухклеточного зародыша с целью изучения их транскриптомов. В результате скрупулезного анализа временных паттернов экспрессии множества генов было установлено, что ZGA начинается уже через 12 ч после опыления и происходит очень динамично. Кроме того, анализ уровней экспрессии генов сигнальных путей позволил выявить гены-регуляторы семейства *WOX*, гомологичные генам зародыша *Arabidopsis thaliana*. Были также идентифицированы гены семейства *MAB* (*ZmMAB1-3*, *ZmMAB6* и *ZmMAB24*), экспрессируемые в базальной клетке двухклеточного зародыша этого злака, и предположительно участвующие в позиционировании веретена деления при первом асимметричном делении зиготы (Chen et al., 2017). Изучение транскриптома активно применяется и по отношению к позднему эмбриогенезу кукурузы. Так, сравнительными исследованиями транскриптомов семян кукурузы дикого типа и мутанта *waxy1* с восковидностью зерновки выявлены 2457 генов, дифференциально экспрессируемых в зрелых зародышах мутанта и участвующих в формировании восковидности (Gu et al., 2020). Транскриптомный анализ заложения апекса зародышевого корня в позднему эмбриогенезу кукурузы дикого типа в сравнении с поздним эмбриогенезом мутанта *rtcs*, лишённого зародышевого корня, позволил установить специфические изменения в динамике активности генов в зародышах каждого генотипа (Tai et al., 2017).

В литературе представлены и результаты молекулярно-генетического анализа развивающихся зародышей риса. Идентифицирован, например, ген *OsASGR-BBML1*, вовлеченный в самый ранний эмбриогенез, и оценено его влияния на индукцию делений зиготы (Deushi et al., 2021). Также выделен ген *GLE4/MPK6*, участвующий в ранней клеточной дифференциации зародыша (Ishimoto et al., 2019). У мутантов риса с гигантскими зародышами клонирован ген *GE*, контролирующей размер зародыша (Hu et al., 2021).

Молекулярно-генетические исследования эмбриогенеза пшеницы усложнены полиплоидностью геномов представителей этого рода (гексаплоидный геном у видов мягкой пшеницы и тетраплоидный геном у видов твердой пшеницы, по Yu et al., 2020 и мн. др.). Были выполнены сравнительные экспериментальные исследования событий альтернативного сплайсинга у этого растения. По их результатам было высказано мнение, что усложнение геномов в ходе эволюции пшеницы, обусловленное полиплоидизацией, привело к расхождениям в регуляции эмбриогенеза на уров-

не генов и транскриптов не только между тетраплоидной и гексаплоидной пшеницами, но и между подгеномами одного вида (Gao et al., 2021). В то же время, несмотря на сложную полиплоидную архитектуру геномов, молекулярные исследования развивающихся зародышей пшеницы также проводятся. Так, изолирован гомеобоксный ген *TaWOX5*, участвующий в координации событий в ходе раннего эмбриогенеза (Zhao et al., 2014), выявлены гены *CD913555*, *CD905348*, *AY148491.1* (Yu et al., 2016) и 179 генов группы *TaLEA* (Liu et al., 2019), принимающие участие в синтезе ряда белков ходе позднего эмбриогенеза.

Не оставлены без внимания исследователей и гены, контролирующие связи между развивающимся зародышем и эндоспермом, например, у кукурузы (Doll et al., 2020; Zheng, 2021; Wang Q. et al., 2022) и пшеницы (Xiang et al., 2019; Gao et al., 2021). Однако анализ этого интересного, но достаточно специфического направления исследований не входит в наши задачи.

Заметим, что авторы рассмотренных выше работ, посвященных выявлению и анализу генов, вовлеченных в развитие зародышей, не выделяют стадии эмбриогенеза изученных злаков. В методической части они сообщают о “незрелом/зрелом зародыше”, “раннем/позднем эмбриогенезе”, без указания каких-либо морфологических или временных показателей. В этой связи проанализировать представленные результаты с позиций критических стадий эмбриогенеза злаков — цели данной статьи — к сожалению, не представляется возможным.

Следует подчеркнуть, что молекулярно-генетические исследования эмбриогенеза злаков все же относительно немногочисленны, в сравнении, например, с аналогичными исследованиями двудольного растения *Arabidopsis thaliana* (Kao et al., 2021 и мн. др.). В то же время эмбриогенез злаков изучен достаточно хорошо с позиций описательной морфологии и структурно-функциональных особенностей специфических зародышевых органов. Полученные данные позволили разработать несколько периодизаций эмбриогенеза злаков.

Периодизации эмбриогенеза злаков

Одна из первых периодизаций развития зародыша злаков приведена в работе У. Мизушими с соавторами (Mizushima et al., 1955), выделившими в эмбриогенезе риса два периода. Во время первого периода, приходящегося на 9 сут после оплодотворения (скорее всего, этот временной интервал шире. — Авт.), происходит морфологическая и физиологическая дифференциация органов зародыша, тогда как второй период, приходящийся на 10 сут до созревания зародыша (на наш взгляд, и этот временной интервал шире. —

Авт.), связан с проявлением функций дифференцированных и развитых зародышевых органов.

Позднее были предложены более детальные периодизации эмбриогенеза представителей этого семейства. В частности, Т.Б. Батыгина (обобщение: 1997а), следуя терминологии Р. Суэжа (Souèges, 1939), выделила в развитии зародыша злаков две фазы: первичная дифференциация, или бластомеризация (от формирования зиготы до обособления эмбриодермы в многоклеточном зародыше) и органогенез (от дифференциации гистогенов в многоклеточном зародыше и обособления зачатков органов до тканевой дифференциации органов). Следует отметить, что термин “бластомеризация” в эмбриологии растений применяется достаточно условно, поскольку, в отличие от животных (например, Gilbert, 2018), в ходе раннего развития зародыша бластомеры как результат дробления зиготы и производных клеток у растений не формируются. Подчеркнем мнение автора о том, что во всех сложных преобразованиях, происходящих в ходе эмбриогенеза, определяющую роль играют последовательные изменения ритма митотической активности и ориентация клеточных делений в разных областях (кластерах) зародыша, что и обуславливает как дорсовентральность строения, так и формирование специфических органов зрелого зародыша злаков.

Н.Н. Круглова (2012), сопоставив морфометрические и временные показатели (длина зародыша, сутки после опыления), а также морфогистологические данные по развитию зародыша, предложила выделять в эмбриогенезе пшеницы этап недифференцированного зародыша (стадии зиготы, двуклеточного, четырехклеточного, многоклеточного зародыша), этап морфологической дифференциации зародыша (стадии раннего, среднего и завершения органогенеза) и этап дифференцированного зародыша (стадии сформированного зародыша и зрелого зародыша). Следует, однако, отметить, что название стадии “многоклеточный зародыш” не совсем удачно, поскольку на всех последующих стадиях эмбриогенеза зародыши также являются многоклеточными.

Необходимо проанализировать немногочисленные, но очень обстоятельные исследования, связанные с выделением стадий эмбриогенеза ряда злаков при составлении пространственно-временных атласов экспрессии генов развивающихся зерновок. Так, для кукурузы дикого типа был проведен анализ транскриптомов зародышей, эндосперма и тканей семени на нескольких стадиях развития зерновки: ранней (от 0 до 8 сут после опыления), средней (от 10 до 28 сут после опыления) и поздней (от 30 до 38 сут после опыления). Важно отметить, что в пределах стадий развития зерновки авторы выделили фазу морфогенеза зародыша (от 10 до 20 сут после опыления) и фазу

созревания зародыша (от 22 до 38 сут после опыления). Исследователи выявили, охарактеризовали и внесли в атлас 26105 генов, специфически экспрессирующихся на той или иной стадии развития зерновки. При этом было продемонстрировано дифференциальное изменение транскриптома в ходе развития у зародыша, эндосперма и перикарпа. В то же время изучение паттерна активации генов, специфически связанных именно с фазами морфогенеза и созревания зародыша, не входило в задачи авторов. Указывается лишь, что фаза морфогенеза связана с активным синтезом ДНК, клеточными делениями и дифференциацией тканей и органов зародыша, а во время фазы созревания происходит активный синтез запасных веществ (Chen et al., 2014b). Позднее, используя временное разрешение с интервалом в 4–6 ч, атлас был уточнен данными о том, что 22790 генов экспрессируются в ходе самого раннего развития зерновки, уже в течение первых 6 суток после опыления. При этом определенные гены специфически экспрессируются при двойном оплодотворении (160 генов), образовании ценоцита эндосперма (22 гена), образовании клеток в эндосперме (112 генов), дифференциации органов зародыша (59 генов) (Yi et al., 2019).

Ближе к теме нашего обзора находятся статьи, посвященные разработке атласа экспрессии генов в ходе эмбриогенеза и развития зерновок 2-х видов полиплоидных пшениц (гексаплоидной *Triticum aestivum* и тетраплоидной *T. turgidum* var. *durum*), а также 3-х видов диплоидных злаков (*T. monococcum*, *Aegilops speltoides*, *Ae. tauschii*) – предполагаемых предков полиплоидных пшениц (Xiang et al., 2019; Gao et al., 2021). Основная цель этих работ состояла в выявлении эволюционного расхождения программ экспрессии генов, оценке вклада субгеномов А, В и D в развитие зерновки полиплоидных пшениц, а также анализе альтернативного сплайсинга в развивающихся зерновках. В то же время вызывает интерес разработанная авторами периодизация эмбриогенеза злаков. На основе анализа морфологических признаков зародышей, проведенного методами световой и сканирующей электронной микроскопии, в развитии зародышей выделены семь стадий: двуклеточный зародыш, проэмбрио, переход к органогенезу, “ранний лист”, “средний лист”, “поздний лист”, зрелый зародыш. При этом возраст зародышей исчислялся в сутках после опыления. Для каждого изученного вида авторы выявили не только общее количество генов, экспрессируемых на всех стадиях развития зерновок (от 11129 до 27897, в зависимости от вида), но и пул генов, специфичных именно для зародышей (от 271 до 995, в зависимости от вида). Отметим тот интересный, на наш взгляд, факт, что большинство специфичных для зародышей генов выявлены на стадиях двуклеточного и зрелого зародышей. В ходе анализа

транскриптомов продемонстрированы достоверные различия в транскрипционных программах во время каждой выделенной стадии эмбриогенеза, в сопоставлении с развитием эндосперма и перикарпа. Как подчеркивают авторы, именно стадия эмбриогенеза (а не конкретный геном/субгеном) важна для паттерна дифференциальной экспрессии генов в развивающихся тканях зерновки изученных злаков. Частично эти работы проанализированы ниже, в связи с выделением критических стадий эмбриогенеза злаков.

Таким образом, стадийность развития зародышей находит свое отражение во всех проанализированных периодизациях эмбриогенеза злаков, различающихся критериями выделения стадий эмбриогенеза.

В целом, среди покрытосеменных растений злаки выделяются особенностями как процесса эмбриогенеза (уникальный Graminad-тип), так и строения зрелого зародыша, органы которого свойственны только представителям этого семейства. Предложены различные периодизации эмбриогенеза злаков, однако единая периодизация отсутствует (в отличие, например, от эмбриогенеза двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, по: Harnvanichvech et al., 2021). По-видимому, во многом это обусловлено не только спецификой эмбриогенеза и оригинальной структурой зародышей злаков, но и использованием различных критериев для выделения стадий их развития: время после опыления, морфометрические параметры, структурные показатели (число клеток и характер делений, гистологические изменения, закладка и дифференциация тех или иных органов), экспрессия транскрипционных факторов и других специфических генов и др. Методическая правомерность использования этих критериев подтверждается экспериментальными данными по структурно-функциональной организации клеток и органов развивающихся зародышей злаков, а также данными по дифференциальной экспрессии генов в ходе развития. Тем не менее, по нашему мнению, более перспективна выработка единого подхода к решению проблемы периодизации эмбриогенеза злаков. Такая периодизация должна учитывать комплекс критериев. Однако базовыми должны стать основные морфогенетические события, происходящие в зародыше на каждой стадии развития и на каждом уровне организации. При этом особое внимание следует уделить такому важному критерию, как последовательные изменения ритмов митотической активности и ориентации клеточных делений в разных кластерах зародыша. Именно этот критерий был положен в основу периодизации эмбриогенеза злаков Т.Б. Батыгиной (обобщения: 1997а, 2014).

Критические стадии эмбриогенеза злаков

Проблема критических стадий эмбриогенеза цветковых растений детально разработана Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой в 1983–2014 гг. (обобщения: Batygina, Vasilyeva, 2003; Батыгина, 2014). Исследователи полагали, что в эволюции зародышей цветковых растений можно видеть становление двух общих фаз – проэмбриональной (бластомеризация) и эмбриональной (органогенез) – включающих общие и специфические критические периоды и стадии. Вопрос, чем можно объяснить сходство организации зародыша у всех современных растений (например, результатом параллельной эволюции или общностью происхождения, по: Терехин, 1996), по мнению авторов, остается открытым.

В основу выделения как общих, так и специфических критических периодов эмбриогенеза Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой положен подход, учитывающий морфогенетические и морфофизиологические корреляции в развитии зародыша. Критическими стадиями авторы называли отрезки времени, характеризующиеся сменой структурно-функциональных характеристик самого зародыша и окружающих его тканей семени и плода.

Одной из важнейших критических стадий эмбриогенеза цветковых растений Т.Б. Батыгина и В.Е. Васильева считали стадию автономности. В данном случае автономность – это особое структурно-функциональное и морфофизиологическое состояние развивающегося зародыша (нового спорофита), способного к саморегуляции, независимого от окружающих тканей, способного завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма и развиваться при этом в нормальное растение (обобщения: Vasilyeva, Batygina, 2006; Батыгина, 2014). В этих работах авторы подняли вопросы эволюции автономности зиготического эмбриогенеза как этапа автономизации онтогенеза (в свете идей И.И. Шмальгаузена, 1982), выделения понятий относительной и полной автономности зародышей цветковых растений. Отметим, что термин “автономность” применительно к зародышу растений был впервые предложен Т.Б. Батыгиной в 1975 г., а в дальнейшем неоднократно обсуждался в литературе (подробнее см.: Vasilyeva, Batygina, 2006).

Подробный анализ этого направления исследований дан в работе Н.Н. Кругловой с соавторами (Kruglova et al., 2020b), в которой на примере злаков проанализированы экспериментальные способы выявления критической стадии автономности зародыша на основе различных критериев, а также морфологический, гистологический и физиологический (гормональный) статус автономных зародышей. В то же время следует еще раз обратить внимание на тот факт, что стадия автономности зародышей представителей этого семейства совпа-

дает со стадией среднего органогенеза (согласно периодизации: Круглова, 2012), что соответствует 15–17-м суткам после опыления. Экспериментально на обширной коллекции пшеницы разных генотипов установлено, что зародыши этой стадии эмбриогенеза в условиях *in vitro* завершают свое развитие вне донорского растения и формируют полноценные фертильные регенеранты (Круглова, 2014). Гистологическими методами выявлено, что у таких зародышей дифференцированы все органы (Круглова и др., 2018), а методами иммуногистохимии в них выявлена локализация эндогенных гормонов — индолил-3-уксусной (ИУК) и абсцизовой (АБК) кислот (Сельдимирова и др., 2017).

Правомерность выделения стадии среднего органогенеза в качестве автономной и критической косвенно подтверждается данными литературы по молекулярно-генетическим характеристикам зародышей пшеницы на стадии “средний лист” (судя по представленным рисункам, соответствует стадии среднего органогенеза. — Авт.). В таких зародышах выявлена повышенная экспрессия генов семейств MYB, BHLH, NAC, WRKY, MADS и bZIP TF, связанных с синтезом крахмала и запасных белков (Xiang et al., 2019). Это сопровождается повышением частоты событий альтернативного сплайсинга в эндосперме, что также может вносить вклад в регуляцию синтеза крахмала и запасных белков (Yu et al., 2020; Gao et al., 2021), а в целом свидетельствует о повышенном метаболизме на данной стадии развития. Аналогичные данные представлены в работе, посвященной ультраструктурным исследованиям клеток формирующихся зародышей пшеницы. Выявлено, что на стадии среднего органогенеза клетки щитка содержат липидные капли и крупные амилопласты, аккумулирующие крахмал (Seldimirova et al., 2017b).

Важно подчеркнуть, что представления Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой о критических стадиях развития зародыша цветковых растений сводились не только к идее об автономизации эмбриогенеза. Они также внесли вклад в развитие теории П.Г. Светлова (1960) о критических периодах эмбриогенеза, в основу выделения которых положен критерий повышенной чувствительности клеток зародыша (у автора — зародыша животных) к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Разработанное Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой положение о смене структурно-функциональных характеристик клеток зародыша растений и детерминации процессов его развития в ходе критических стадий эмбриогенеза логично объясняло особую чувствительность эмбриональных структур к действию неблагоприятных факторов (возникновение аномалий, остановка развития зародыша, переключение программы развития на альтернативные пути).

Это положение получило экспериментальные подтверждения в работах, выполненных на зародышах злаков в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, были проведены многолетние исследования воздействия повышенных и пониженных температур на развивающиеся зародыши пшеницы. В результате получены данные о частичном (а при некоторых условиях и полном) блокировании эмбриогенеза на двух стадиях — глобулярного зародыша и инициального органогенеза, которые авторы расценивали как критические (Банникова и др., 1991).

Особая чувствительность зародышей пшеницы на этих стадиях подтверждается и результатами изучения влияния ряда ингибиторов полярного транспорта ауксинов на становление билатеральной симметрии (Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001). Исследователи установили, что воздействии N-1-нафтилфталамовой кислоты и кварцетина на изолированные зародыши в условиях *in vitro* приводит к формированию зародышей аномальных фенотипов, в том числе с множественными органами различной топографии (“сиамские зародыши спина-к-спине”, “сердечковидные сиамские зародыши” и др.). При этом была выявлена четкая зависимость частоты возникновения аномалий не только от типа и концентрации использованных ингибиторов, но и от глобулярной и переходной к органогенезу стадий развития инокулированных зародышей. Авторы предположили, что физиологический механизм формирования аномальных фенотипов состоит в нарушении полярных потоков ауксинов при становлении билатеральной симметрии зародышей во время перехода от глобулярной стадии к органогенезу. Сходные данные получены Г.Е. Титовой с соавторами (Titova et al., 2016), выявившими образование аналогичных аномальных фенотипов при воздействии *in vitro* синтетического ауксина 2,4-Д на микроспориальные эмбриониды пшеницы на глобулярной или переходной к органогенезу стадиях (все эти фенотипы были классифицированы как “полимерные зародыши”, или “полиэмбриониды”).

“Критичность” глобулярной и переходной к органогенезу стадий развития зародышей в отношении полярного транспорта ауксинов подтверждена и для кукурузы. Был выполнен анализ динамики локализации свободного эндогенного ауксина ИУК и переносчика ауксина — трансмембранного белка ZmPIN1 (использовались специфические моноклональные антитела). Оказалось, что становление активного полярного потока ауксинов в клетках зародыша происходит именно на переходной к органогенезу стадии (при смене радиальной симметрии зародыша на билатеральную), в направлении от базального к апикальному полюсу зародыша. При этом полярный перенос ауксинов коррелирует с дифференциацией тканей за-

родыша (Forestan et al., 2010; Forestan, Varotto, 2012; Chen et al., 2014a). У мутантов кукурузы *Shai1*, характеризующихся различными дефектами морфологии зародыша, также во время раннего органогенеза выявлено изменение полярного транспорта ауксина, приводящее к формированию крайне редуцированного щитка, бифуркации оси побега и остановке развития зародыша (к сожалению, авторы не конкретизируют стадию эмбриогенеза) (Mimura et al., 2018). Сходные данные получены для ячменя: содержание эндогенного ауксина в клетках соматических зародышей *in vitro* повышалось по мере перехода от стадии раннего проэмбрио к стадии закладки органов, что коррелировало с экспрессией гена *HvTAR2*, участвующего в биосинтезе ауксина (Perez-Perez et al., 2019).

На наш взгляд, одним из важных перспективных направлений в биологии развития является дальнейший анализ различных аномалий в эмбриогенезе цветковых растений при нарушении полярного транспорта ауксинов. Этот анализ целесообразно проводить с позиции теории критических периодов эмбриогенеза. Также перспективны и эксперименты по исследованию нарушений гормональных связей зародыша и эндосперма на критических стадиях эмбриогенеза, проявляющихся под действием внешних факторов. Значимость для нормального эмбриогенеза координированных связей в системе “зародыш—эндосперм” и их взаимных сигнальных влияний показана как для злаков (An et al., 2020), так и для других цветковых растений (Song et al., 2021).

В свете идей, заложенных в работах Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой, особый интерес представляет способность зародышей цветковых растений на критических стадиях к переключению программы развития на альтернативные пути морфогенеза. К таким путям можно отнести каллусогенез *in vitro* при воздействии адекватных факторов культуральной среды.

Заметим, что в этой статье мы анализируем работы, связанные с изучением именно морфогенных (в том числе эмбриогенных), каллусов, поскольку в различных условиях *in vitro* из разных эксплантов могут быть получены и неморфогенные каллусы (подробнее см.: Зинатуллина, 2020б).

Каллус традиционно определяется как пролиферирующая масса дедифференцированных клеток (Feher, 2019; Chiam et al., 2019) или как масса плюрипотентных клеток (Wang Y. et al., 2022a). Т.Б. Батыгиной (2014 и ранее) принадлежит более функциональное определение каллуса: это интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растения), так и эндогенно (в глубине тканей растения), изначально состоящая из однородных клеток, постепенно

преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток, которые имеют морфогенетические потенции, реализуемые различными путями морфогенеза.

Многочисленными исследованиями на примере различных видов растений выявлено, что клетки/группы клеток каллуса способны дать начало полноценному растению-регенеранту (по: Kruglova et al., 2018a; Bidabadi, Jain, 2020; Raspor et al., 2021 и мн. др.). Каллусогенез *in vitro* оценивается как проявление пластичности морфогенеза растений (Christiaens et al., 2021 и др.). Механизмы каллусообразования хорошо изучены на примере *Arabidopsis thaliana* (подробнее см.: Ikeuchi et al., 2019), однако злаки в этом отношении исследованы пока недостаточно.

В контексте данной статьи необходимо обратить внимание на стадию эмбриогенеза незрелых зародышей злаков, дающих начало каллусам *in vitro*. Именно эту стадию можно рассматривать как критическую, во время которой происходит переключение программы развития зародыша. Детальными исследованиями растений пшеницы, принадлежащих к разным группам генотипов, установлено, что такие зародыши находились на стадии раннего органогенеза (по периодизации: Круглова, 2012), соответствующей 12–14-м суткам после опыления. Гистологическими методами выявлено, что каллусы формировались из меристематических клеток эпидермиса щитка (Круглова и др., 2019a). Отметим, что данные о формировании каллуса из эпидермальных клеток щитка незрелых зародышей (без указания стадии эмбриогенеза) получены и для кукурузы (Du et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019). Установлено, что клетки щитка зародышей пшеницы на стадии раннего органогенеза характеризуются высокой метаболической активностью. Об этом свидетельствуют особенности их ультраструктуры: значительное количество свободных рибосом, амилопластов, единичных развитых хлоропластов, митохондрий с хорошо развитыми внутренними мембранами, активный комплекс Гольджи и гранулярный эндоплазматический ретикулум (Seldimirova et al., 2017b). У ячменя выявлено резкое увеличение содержания эндогенных гормонов — ИУК и цитокининов — в зародышах этой стадии по сравнению с предыдущими стадиями эмбриогенеза (Seldimirova et al., 2019).

Детальные исследования молекулярно-генетических механизмов формирования каллусов *in vitro* из незрелых зародышей злаков, находящихся на критической стадии эмбриогенеза, проведены на примере кукурузы. Одна из первых работ в этой области выполнена И. Шеном с соавторами (Shen et al., 2012). Исследователи инокулировали незрелые зародыши длиной 1.5–1.8 мм через 12 сут после опыления (стадию эмбриогенеза авторы не

указали). В результате анализа дифференциальной экспрессии генов на трех последовательных этапах культивирования *in vitro* (через 1–5, 6–10, 11–15 сут после инокуляции) авторы выявили экспрессию 251, 324 и 313 генов, специфичных для этих последовательных этапов и влияющих на дедифференциацию зародышей и образование эмбриогенных каллусов. Экспрессируемые гены были связаны главным образом с транспортом и метаболизмом аминокислот и углеводов, а также развитием клеточных оболочек. Позднее был проведен анализ транскриптомов незрелых зародышей кукурузы, инокулированных через 10–12 сут после опыления (авторы этой работы также не указывали стадию эмбриогенеза). В течение первых 8 сут культивирования *in vitro* были выявлены 7525 генов, индуцированных действием экзогенного ауксина 2,4-Д. Эти гены были связаны преимущественно с трансмиссией и трансдукцией сигналов, влияющих на формирование эмбриогенных каллусов (Du et al., 2019). Кроме того, установлена важная роль некоторых miРНК (miR156, miR160 и miR166) в репрограммировании развития незрелых зародышей кукурузы по пути каллусогенеза *in vitro* (Lopez-Ruiz et al., 2019).

В последнее время опубликовано немало обзоров, посвященных оценке компетентности клеток различных эксплантов к формированию каллуса *in vitro* (Kruglova et al., 2018a; Radhakrishnan et al., 2018; Feher, 2019; Gordon-Camm et al., 2019; Ikeuchi et al., 2019; Sugimoto et al., 2019; Bidabadi, Jain, 2020; Kruglova et al., 2021; Raspor et al., 2021; Круглова, 2022). В этой области получены и новые экспериментальные данные по зародышам кукурузы (Du et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019; Wang Y. et al., 2022b) и пшеницы (Seldimirova et al., 2017b; Круглова и др., 2019a). Анализ этих работ позволяет высказать мнение о роли экспланта в индукции каллусообразования *in vitro*. Мы полагаем, что к формированию каллусов *in vitro* компетентны клетки определенного органа экспланта (в частности, щитка зародыша злаков) на достаточно ранней стадии развития (в частности, ранний органогенез зародыша). Компетентность таких клеток к каллусообразованию *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от их статуса в момент инокуляции, а именно – меристематичности, что обуславливает способность к репрограммированию в плюрипотентное состояние на индукционной среде *in vitro*. Кроме того, меристематические клетки таких эксплантов не только морфогенетически компетентны и плюрипотентны, но и, по-видимому, тотипотентны, поскольку являются исходными для клеток/групп клеток каллусов, реализующих различные пути морфогенеза *in vitro* на регенерационной среде.

Таким образом, стадию раннего органогенеза можно определить как еще одну критическую в эмбриогенезе злаков, наряду с рассмотренными

выше глобулярной стадией и стадией среднего органогенеза. В данном случае критерием “критичности” является способность незрелого зародыша к смене программы развития на альтернативную: формирование каллуса вместо завершения эмбриогенеза.

Следует отметить, что зиготические зародыши злаков критических стадий эмбриогенеза могут переключаться при определенных условиях *in vitro* не только на каллусогенез, но и на другие альтернативные пути морфогенеза. Примером могут служить упомянутые выше фенотипы половых и микроспориальных “сиамских зародышей” пшеницы, формирующиеся *in vitro* под действием ингибиторов полярного транспорта ауксинов (Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001; Titova et al., 2016), которые можно рассматривать как результат смены программы развития полового зародыша. С точки зрения Г.Е. Титовой с соавторами (Titova et al., 2016), формирование различных фенотипов “сиамских зародышей” (полимерных зародышей, или полиэмбриоидов) является результатом поздней, незавершенной кливажной полиэмбрионии, сопровождающейся радиальной, линейной и кольцевой фасциациями. При этом проявление кливажной полиэмбрионии именно на глобулярной стадии развития зародыша может быть обусловлено более высокой чувствительностью клеток к различным воздействиям, чем на стадиях зиготы и раннего проэмбрио. Согласно Т.Б. Батыгиной (см. Batygina, Osadtchiy, 2013), кливажная полиэмбриония может рассматриваться как способ образования соматических зародышей (эмбриоидов) на базе дочернего спорофита – из клеток зиготы или многоклеточного зиготического зародыша. Другими словами, это переключение программы развития “эмбриогенез → соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез)”. В то же время, наличие непрерывных переходных состояний между разными фенотипами сиамских зародышей и их трактовка как результата перехода от одного типа фасциаций к другому (Titova et al., 2016) может указывать и на более глобальную смену программы развития зиготического зародыша цветковых растений в процессе эволюции. В частности, возникновение двух основных линий эволюции зародыша (дикотилия и монокотилия) может быть связано с процессом незавершенной кливажной полиэмбрионии и образованием разных фенотипов сиамских зародышей, а переход от ди- к монокотилии являться следствием линейной фасциации органов двусемядольного зародыша. При этом так называемая “латеральность”, уникальная для апекса побега однодольного зародыша, по сути, представляет искривление его оси – один из характерных признаков проявления линейных фасциаций у растений (Титова, 2019).

Таким образом, в эмбриогенезе злаков достаточно достоверно можно выделить ряд критических стадий на основании таких критериев, как а) способность зародыша к саморегуляции и его независимость от материнского организма (автономность); б) повышенная чувствительность зародыша к воздействию внешних неблагоприятных факторов, вплоть до индуцирования аномалий, а также частичного или полного блокирования развития; в) способность зародыша к смене программы развития на альтернативные пути. Согласно различным периодизациям, к критическим стадиям эмбриогенеза злаков следует отнести глобулярную стадию и органогенез (включая переход к органогенезу, ранний (инициальный) органогенез и средний органогенез, соответствующий дифференциации органов).

Перспективы использования критических стадий эмбриогенеза злаков в прикладных исследованиях в целях селекции

Выявление и изучение критических стадий развития зародыша злаков важно не только в теоретическом отношении, но и с позиций практического использования в различных селекционных программах.

Перспективное прикладное направление состоит в использовании зародышей злаков на критических стадиях эмбриогенеза в биотехнологии для адаптивной селекции по признаку устойчивости к действию абиотических стрессоров, в частности, к засухе. Важность решения проблемы засухоустойчивости растений трудно переоценить. Физиологическая засуха приводит к значительным потерям урожая хлебных злаков не только в засушливых, но и в полузасушливых регионах, вплоть до возникновения угрозы продовольственной безопасности (Plant life..., 2020). Самими растениями на разных уровнях организации выработаны морфологические, физиологические, биохимические и иные способы стратегической адаптации к этому стресс-фактору (обзоры: Liu et al., 2020; Kandel, 2021; Yadav et al., 2021). Несмотря на это, исследователи активно разрабатывают различные подходы к созданию засухоустойчивых сортов хлебных злаков по способности формировать относительно высокий уровень урожайности в условиях дефицита воды (Зинатуллина, 2020а; Ali et al., 2020; Mao et al., 2021 и др.). Привлекаются и биотехнологические методы культуры *in vitro* (Maleki et al., 2019; Rykalo et al., 2019 и др.). При этом исследователи, как правило, исходят из того базового принципа, что регенерация в культуре *in vitro* определяется в первую очередь особенностями генотипа донорского растения (Ibanez et al., 2020 и др.).

Успех адаптивной селекции на устойчивость к физиологической засухе в значительной степени

зависит от раннего диагностирования признака “засухоустойчивость” у создаваемых генотипов (Guo et al., 2021). Дать оценку засухоустойчивости вновь созданных гибридных комбинаций на самых ранних этапах их онтогенеза возможно на основе использования эмбриокультуры — метода культивирования *in vitro* разновозрастных зиготических зародышей (Plant Embryo Culture, 2011). Безусловная перспективность этого метода в выявлении стресс-устойчивых растений определяется, на наш взгляд, тем, что зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма (Батыгина, 2014), в том числе способностью противостоять стрессам.

Многочисленными исследованиями выявлены два пути формирования регенерантов в эмбриокультуре *in vitro* — прямой (регенеранты формируются непосредственно из зародышей согласно схеме “один зародыш → один регенерант”) и непрямой (регенеранты формируются из зародышевых каллусов согласно схеме “один зародыш → один каллус → несколько регенерантов”).

По нашему мнению, биотехнологам следует обратить особое внимание на использование прямой эмбриокультуры *in vitro* именно автономных зародышей злаков. Как показано выше, такие незрелые зародыши, находящиеся на критической стадии эмбриогенеза, по своему морфологическому, гистологическому и гормональному статусу готовы к автономному развитию, не зависящему от материнского организма. В то же время структурная и функциональная дифференциация таких зародышей обусловлена не только их собственным генотипом (тип эмбриогенеза, специфика развития), но и — опосредованно — генотипом всего материнского организма (Vasilyeva, Batygina, 2006), в том числе способностью материнской особи противостоять засухе. Автономные зародыши засухоустойчивых генотипов, инокулированные *in vitro* во время критической стадии эмбриогенеза на селективные питательные среды, имитирующие дефицит влаги, в оптимальных условиях могут дать начало засухоустойчивым регенерантам. Перспективность использования прямой эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей злаков определяется и тем, что выявление и селективный отбор толерантных к дефициту воды незрелых зародышей позволяет дать экспресс-оценку засухоустойчивости вновь создаваемого гибрида. Ускорение селекционных разработок в данном случае достигается за счет того, что новый генотип диагностируется на засухоустойчивость на самой ранней стадии онтогенеза — зародыше, а не путем лабораторной оценки зрелых зерновок или полевой оценки растений, как это принято в рутинной селекционной практике.

Несмотря на обоснованность и перспективность культивирования *in vitro* незрелых зароды-

шей злаков на критической стадии автономности с целью создания засухоустойчивых генотипов, практических результатов таких исследований в литературе представлено сравнительно немного (по: Kruglova, Zinatullina, 2022). В качестве примера можно привести итоги многолетних исследований автономных зародышей обширной коллекции пшеницы родительских сортов и гибридных линий, полученных прямыми и реципрокными скрещиваниями (Круглова и др., 2018, 2019б; Зинатуллина, Никонов, 2021; Круглова, Сельдимирова, 2022). Авторы применили комплексный критерий оценки засухоустойчивости генотипов. Они воздействовали на автономные зародыши, находящиеся на критической стадии среднего органогенеза, условиями, имитирующими дефицит влаги. Это воздействие достигалось введением в состав питательной среды ряда осмотиков сублетальных концентраций. Оценивалась способность таких зародышей дать начало проросткам, развивающимся до фазы кушения *in vitro* и фазы полной спелости зерна в почвенных условиях *ex vitro*. Были проанализированы лабораторная всхожесть полученных зерновок и эмбриональные показатели растений, выращенных из таких зерновок в полевых условиях. В результате выявлены и включены в селекционные программы засухоустойчивые генотипы, характеризующиеся следующими свойствами: их автономные зародыши могут формировать проростки нормальной морфологии в условиях имитации засухи; достаточно высокая лабораторная всхожесть полученных зерновок; отсутствие аномалий в эмбриогенезе полученных растений.

Непрямой путь образования регенерантов злаков в эмбриокультуре *in vitro* также должен заслуживать внимания биотехнологов. Этот путь состоит в получении каллусов из зародышей на критической стадии раннего органогенеза, переносе каллусов на регенерационную среду, получении из них регенерантов. Несмотря на то, что дополнительный этап формирования зародышевых каллусов и индукции в них регенерации приводит к увеличению длительности экспериментов, непрямая эмбриокультура *in vitro* имеет ряд несомненных преимуществ для оценки засухоустойчивости селекционных образцов. Так, для культуры *in vitro* можно задать параметры селективных условий (точно так же, как задаются условия засухи), а затем детально проанализировать реакции клеток и тканей каллусов на действие стресс-фактора. Кроме того, в культуре *in vitro* при добавлении стресс-агента в селективную среду происходит непосредственное взаимодействие со стрессором практически всех клеток каллуса. Тем самым создается возможность исследования механизмов действия стрессоров на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Важно и то, что культивирование *in vitro* зародышевых каллусов на регенерационной селективной среде, имитирующей засуху, позволяет не только получить,

но и тиражировать засухоустойчивые регенеранты (по: Kruglova et al., 2018b; Зинатуллина, 2020б). Основное же преимущество использования зародышевых каллусов состоит в сходстве морфогенетических процессов, протекающих в растениях *in vivo* и в культивируемых каллусах *in vitro* в ответ на действие абиотических факторов. В таком сходстве реакций можно видеть действие принципа универсальности путей морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях, выдвинутого Т.Б. Батыгиной (2014 и ранее).

В то же время, данное направление биотехнологических исследований – использование каллусных культур зародышевого происхождения для оценки засухоустойчивости получаемых регенерантов злаков – разработано крайне недостаточно. Помимо того, что таких работ сравнительно немного, в качестве эксплантов для получения каллусов используются зародыши, для которых не определена стадия эмбриогенеза (по: Зинатуллина, 2020б). Разработки по получению засухоустойчивых регенерантов злаков в каллусной культуре, в которых имеются сведения о применении в качестве эксплантов незрелых зародышей критических стадий эмбриогенеза, единичны. Так, успешное использование в качестве эксплантов зародышей на критической стадии раннего органогенеза продемонстрировано в работе О.А. Сельдимировой с соавторами (Seldimirova et al., 2017a). Эта работа посвящена исследованию влияния антитрессового регулятора роста растений 24-эпибрассинолида на формирование и рост каллусов, а также регенерацию из них засухоустойчивых проростков пшеницы.

Безусловно, возможны и другие направления прикладного использования зародышей злаков, находящихся на тех или иных критических стадиях эмбриогенеза. Большой интерес в этом отношении вызывают зародыши на глобулярной и переходной к органогенезу стадиях эмбриогенеза. Как было сказано выше, микроспориальные соматические зародыши пшеницы во время этих стадий в определенных экспериментальных условиях *in vitro* способны к переключению программы развития на альтернативные пути, ведущие к формированию фенотипов полимерных “сиамских” зародышей с множественными органами и различной топографией их положения (Titova et al., 2016). Как полагают авторы, использование таких полимерных зародышей может оказаться успешным в селекционных разработках новых форм пшеницы с повышенной зерновой продуктивностью.

В целом, применение экспериментальных систем с использованием зародышей злаков, находящихся на различных критических стадиях эмбриогенеза, весьма перспективно для биотехнологиче-

ских селекционных разработок. Предпосылкой для использования таких систем является сходство ответных реакций растений *in vivo* и эксплантов/регенерантов *in vitro*, основанное на универсальности путей морфогенеза (Батыгина, 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В биологии развития растений проблема критических периодов и стадий эмбриогенеза разрабатывается с позиций системного подхода к дифференциации зародыша, который учитывает наличие морфогенетических и морфофизиологических корреляций в развитии эмбриональных структур и окружающих тканей семени и плода.

Особый интерес вызывают критические стадии эмбриогенеза злаков, поскольку зародыш представителей этого семейства выделяется среди зародышей цветковых растений как особым Graminad-типом эмбриогенеза, так и формированием специфических органов.

Теоретически и экспериментально показано, что в эмбриогенезе злаков можно выделить ряд критических стадий на основании таких критериев, как а) способность зародыша к саморегуляции и его независимость от материнского организма (автономность); б) повышенная чувствительность зародыша к воздействию внешних неблагоприятных факторов, вплоть до индуцирования аномалий, а также частичного или полного блокирования развития (этот критерий во многом совпадает с критерием выделения критических периодов в эмбриогенезе животных); в) способность зародыша к смене программы развития на альтернативные пути.

Согласно периодизациям эмбриогенеза, предложенным разными авторами, к таким критическим стадиям следует отнести глобулярную стадию и органогенез (включая переход к органогенезу, ранний (инициальный) органогенез и средний органогенез, соответствующий дифференциации органов). Теоретически, для злаков, как и представителей других семейств цветковых растений, возможно существование и иных критериев выделения критических стадий, и иных критических стадий эмбриогенеза. Однако при этом важно выработать единый подход к периодизации сложного многоступенчатого процесса эмбриогенеза злаков на основе комплексных критериев и, прежде всего, — морфогенетических событий, происходящих в развивающемся зародыше на каждом уровне организации.

В целом же следует признать, что хотя проблема критических стадий развития зародыша цветковых растений поставлена достаточно давно, единый подход к ее решению, как и единые критерии выделения таких стадий и унифицированная терминология, еще не разработаны. Отсутствуют и

сравнительные аналитические исследования критических стадий эмбриогенеза растений и животных, хотя само понятие “критические стадии эмбриогенеза”, по-видимому, следует отнести к общебиологическим. Немногочисленны экспериментальные верификации в этой области исследований. Прикладное применение зародышей на критических стадиях эмбриогенеза только начинает разрабатываться. Сейчас оно ограничено биотехнологическими разработками, в которых используются прямые и непрямые эмбриокультуры *in vitro* хлебных злаков.

Решение перечисленных вопросов зависит, в первую очередь, от дальнейших исследований последовательных стадий зиготического эмбриогенеза цветковых растений, главным образом с использованием молекулярно-генетических подходов. Однако не менее важно проводить аналогичные исследования соматического эмбриогенеза тех же объектов в контролируемых условиях культуры *in vitro*. Сравнение стадий развития зиготического и соматического зародышей может способствовать выявлению общих закономерностей и специфических черт этих процессов, а также выделению и дальнейшему изучению критических стадий эмбриогенеза растений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность к. б. н. В.Е. Васильевой, соавтору Т.Б. Батыгиной в многолетних исследованиях проблемы критических стадий эмбриогенеза цветковых растений, за ценные советы при обсуждении некоторых положений статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.Н. Круглова и А.Е. Зинатуллина подготовили первоначальный вариант текста обзора с использова-

нием данных, представленных в литературе, а также результатов собственных исследований. Г.Е. Титова проанализировала основные положения статьи и внесла существенные дополнения. Все авторы участвовали в обсуждении окончательного варианта статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А. и др. Основы эмбриогенеза злаков / Отв. ред. Яковлев М.С. Киев: Наукова думка, 1991. 176 с.
- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997а. С. 528–538.
- Батыгина Т.Б. Graminad-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997б. С. 520–526.
- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Зинатуллина А.Е. Модельная система “зародыш–зародышевый каллус” в экспресс-оценке стрессовых и антистрессовых воздействий (на примере злаков) // Экобиотех. 2020а. Т. 3. № 1. С. 38–50.
- Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи соврем. биол. 2020б. Т. 140. № 2. С. 183–194.
- Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Лабораторная оценка регенерантов гибридных комбинаций пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro* // Экобиотех. 2021. Т. 4. № 2. С. 81–88.
- Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2012. № 2. С. 21–24.
- Круглова Н.Н. Выявление автономности зародыша пшеницы как этап разработки экспресс-диагностической биотехнологии получения засухоустойчивых образцов // Перм. агр. вестн. 2014. № 1(5). С. 38–43.
- Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклиной гаплоидии пшеницы на основе комплекса эмбриологических и цитофизиологических данных // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 234–245.
- Круглова Н.Н. Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* у злаков: роль гормонального баланса // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2022. № 1. С. 52–59.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас. М.: Наука, 2005. 99 с.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Эмбриогенез *in vivo* засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы, полученных в эмбриокультуре *in vitro* // Таврич. вестн. агр. науки. 2022. № 1(29). С. 65–78.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Гистологический статус зародыша пшеницы в стадии органогенеза *in vivo*, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2019а. № 1. С. 25–29.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление относительной автономности *in planta* зиготических зародышей яровой мягкой пшеницы для оптимизации биотехнологических исследований // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2018. № 3. С. 28–33.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых генотипов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестник БГАУ. 2019б. Т. 52. № 4. С. 27–41.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии. М.; Л.: АН СССР, 1960. С. 263–285.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н. и др. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2017. № 3. С. 114–118.
- Терёхин Э.С. Семя и семенное размножение. СПб.: Мир и семья, 1996. 376 с.
- Титова Г.Е. Проблема моноктилии с позиций данных эмбриологии растений // Тез. докл. Всеросс. науч. конф. с междунар. участием “Инновации и традиции в современной ботанике”. СПб.: БИН РАН, 2019. С. 106.
- Цвелёв Н.Н. Проблемы теоретической морфологии и эволюции высших растений: сборник избранных трудов. М.; СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 407 с.
- Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 350 с.
- Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.: Наука, 1982. 383 с.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. 830 с.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 2000. 639 с.
- Ali M., Hasan H., Bux H. et al. Role of transcription factors in drought mediating pathways in wheat // Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat. Chapter 11 / Eds. Ozturk M., Gul A. Acad. Press, 2020. P. 177–192.
- An L., Tao Y., Chen H. et al. Embryo-endosperm interaction and its agronomic relevance to rice quality // Front Plant Sci. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587641>
- Armenta-Medina A., Gillmor C.S., Gao P. et al. Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops // Plant Commun. 2020. V. 2. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100136>
- Baskin C., Baskin J. Relationship of the lateral embryo (in grasses) to other monocot embryos: a status up-grade // Seed Sci. Res. 2021. V. 31. P. 199–210.
- Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Int. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. P. 107–120.

- Batygina T.B., Osadchiy J.V.* Polyembryony: twins – the result of vegetative propagation // *Int. J. Plant Reprod. Biol.* 2013. V. 5. P. 21–27.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2003. V. 45. P. 27–36.
- Bidabadi S.S., Jain S.M.* Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration // *Plants*. 2020. V. 9. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Chen H., Miao Y., Wang K., Bayer M.* Zygotic embryogenesis in flowering plants // *Methods Mol. Biol.* 2021. Iss. 2288. P. 73–88.
- Chen J., Lausser A., Dresselhaus T.* Hormonal responses during early embryogenesis in maize // *Biochem. Soc. Trans.* 2014a. V. 42. P. 325–331.
- Chen J., Strieder N., Krohn N.G. et al.* Zygotic genome activation occurs shortly after fertilization in maize // *Plant Cell*. 2017. V. 29. P. 2106–2125.
- Chen J., Zeng B., Zhang M. et al.* Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development // *Plant Physiol.* 2014b. V. 166. P. 252–264.
- Chiam N.C., Fujimura T., Sano R. et al.* Nonsense-mediated mRNA decay deficiency affects the auxin response and shoot regeneration in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 2000–2014.
- Christiaens F., Canher B., Lanssens F. et al.* Pars pro toto: every single cell matters // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656825>
- de Vries S.C., Weijers D.* Plant embryogenesis // *Curr. Biol.* 2017. V. 27. P. 870–873.
- Deushi R., Toda E., Koshimura S. et al.* Effect of paternal genome excess on the developmental and gene expression profiles of polyspermic zygotes in rice // *Plants*. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/plants10020255>
- Doll N.M., Just J., Brunaud V. et al.* Transcriptomics at maize embryo/endosperm interfaces identifies a transcriptionally distinct endosperm subdomain adjacent to the embryo scutellum // *Plant Cell*. 2020. V. 32. P. 833–852.
- Du X., Fang T., Liu Y., Huang L. et al.* Transcriptome profiling predicts new genes to promote maize callus formation and transformation // *Front Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01633>
- Fehér A.* Callus, Dedifferentiation, Totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // *Front. Plant Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G.* Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1767–1780.
- Fischer-Iglesias C., Sundberg B., Neuhaus G. et al.* Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat // *Plant J.* 2001. V. 26. P. 115–129.
- Forestan C., Meda S., Varotto S.* ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // *Plant Physiol.* 2010. V. 152. P. 1373–1390.
- Forestan C., Varotto S.* The role of pin auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development // *Mol. Plant*. 2012. V. 5. P. 787–798.
- Gao P., Quilichini T.D., Zhai C. et al.* Alternative splicing dynamics and evolutionary divergence during embryogenesis in wheat species // *Plant Biotech. J.* 2021. V. 19. P. 1624–1643.
- Gilbert S.F.* Developmental biology. 11th ed. / Ed. Mayers R. 2018. URL: <https://www.pdfdrive.com/developmental-biology-e188565455.html>
- Gordon-Camm B., Sardesai N., Arling M. et al.* Using morphogenic genes to improve and regeneration of transgenic plants // *Plants*. 2019. V. 8. <https://doi.org/10.3390/plants8020038>
- Gu W., Yu D., Guan Y. et al.* The dynamic transcriptome of waxy maize (*Zea mays* L. *sinensis* Kulesh) during seed development // *Genes Genom.* 2020. V. 42. P. 997–1010.
- Guo J., Gu X., Lu D.* Multiomics analysis of kernel development in response to short-term heat stress at the grain formation stage in waxy maize // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 6291–6304.
- Harnvanichvech Y., Gorelova V., Sprakel J., Weijers D.* The *Arabidopsis* embryo as a quantifiable model for studying pattern formation // *Quant. Plant Biol.* 2021. V. 2. P. 1–13.
- Hu Z., Xiong Q., Wang K. et al.* Identification of a new giant embryo allele, and integrated transcriptomics and metabolomics analysis of giant embryo development in rice // *Front. Plant Sci.* 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697889>
- Ibanez S., Carneros E., Testillano P.S., Perez-Perez J.M.* Advances in plant regeneration: Shake, rattle and Roll // *Plants*. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9070897>
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al.* Molecular mechanisms of plant regeneration // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406.
- Ishimoto K., Sohonahra S., Kishi-Kaboshi M. et al.* Specification of basal region identity after asymmetric zygotic division requires mitogen-activated protein kinase 6 in rice // *Development*. 2019. V. 146. <https://doi.org/10.1242/dev.176305>
- Itoh J.-I., Nonomura K.-I., Ikeda K. et al.* Rice plant development: from zygote to spikelet // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 23–47.
- Johansen D.A.* Plant Embryology. Waltham, MA: Chronica Botanica, 1950. 305 p.
- Kandel S.* Wheat responses, defence mechanisms and tolerance to drought stress: A review article // *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechn.* 2021. V. 8. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.5.14>
- Kao P., Schon M.A., Mosiolek M. et al.* Gene expression variation in *Arabidopsis* embryos at single-nucleus resolution // *Development*. 2021. V. 148. <https://doi.org/10.1242/dev.199589>
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A.* Callusogenesis as a *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018a. V. 49. P. 245–259.
- Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E.* *In vitro* callus as a model system for the study of plant stress-resistance to abiotic factors (on the example of cereals) // *Biol. Bull. Rev.* 2018b. V. 8. P. 518–526.

- Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // *Biol. Bull. Rev.* 2020a. V. 10. P. 115–126.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. et al. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals) // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020b. V. 51. P. 1–15.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Cytophysiological features of the cereal-based experimental system “embryo *in vivo* – callus *in vitro*” // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. P. 199–214.
- Kruglova N.N., Zinatulina A.E. *In vitro* culture of autonomic embryos as a model system for the study of plant stress tolerance to abiotic factors (on the example of cereals) // *Biol. Bull. Rev.* 2022. V. 12. P. 201–211.
- Landge A.N., Radhakrishnan D., Kareem A., Prasad K. Intermediate developmental phases during regeneration // *Plant Cell Physiol.* 2018. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy011>
- Liu H., Xing M., Yang W. et al. Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (*LEA*) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum*) // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49759-w>
- Liu Y., Zhang M., Meng Z. et al. Research progress on the roles of cytokinin in plant response to stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21186574>
- Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E. et al. Development-related miRNA expression and target regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of tuxpeno VS-535 maize cultivar // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092079>
- Maleki M., Ghorbanpour M., Nikabadi S. et al. In Vitro Screening of Crop Plants for Abiotic Stress Tolerance / Ed. Wani S. Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change. Cham: Springer, 2019. P. 75–91.
- Mao H., Li S., Chen B. et al. Variation in *cis*-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat // *Mol. Plant.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.11.007>
- Mimura M., Kudo T., Wu S. et al. Autonomous and non-autonomous functions of the maize Shohail gene, encoding a RWP-RK putative transcription factor, in regulation of embryo and endosperm development // *Plant J.* 2018. <https://doi.org/10.1111/tpj.13996>
- Mizushima U., Murakami K., Hozyo Y. Influence of anomalous environmental conditions upon embryogenesis in the rice plant, *Oryza sativa* L. II. Abnormal development induced by chemical substances // *Tohoku J. Agric. Res.* 1955. V. VI. P. 179–206.
- Pabon-Mora N., Goldman M.H.S., Smyth D.R. et al. Molecular mechanisms of flowering plant reproduction // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.828136>
- Perez-Perez I., El-Tantawy A., Solis M.T. et al. Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01200>
- Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / Eds. Thorpe T.A., Yeung E.C. N.Y.: London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.
- Plant Life under Changing Environment: Responses and Management / Ed. Tripathi D.K. Acad. Press (Elsevier), 2020. 1020 p.
- Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T. et al. Comparative assessment of methods for evaluation of drought tolerance in winter bread wheat varieties // *ScienceRise: Biol. Sci.* 2019. № 4(19). <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2019.186813>
- Radhakrishnan D., Kareem A., Durgaprasad K. et al. Shoot regeneration: a journey from acquisition of competence to completion // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 41. P. 23–31.
- Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z., Weijer D. Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis // *Dev. Cell.* 2019. V. 50. P. 533–543.
- Raspor M., Motyka V., Kaleri A.R. et al. Integrating the roles for cytokinin and auxin in *de novo* shoot organogenesis: From hormone uptake to signaling outputs // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>
- Richardson M. Heterochrony and the phylotypic period // *Dev. Biol.* 1995. V. 172. P. 412–421.
- Seldimirova O.A., Bezrukova M.V., Galin I.R. et al. 24-Epi-brassinolide effect on *in vitro* callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017a. V. 64. P. 919–929.
- Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Titova G.E., Batygina T.B. Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo* zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development // *Russ. J. Dev. Biol.* 2017b. V. 48. P. 185–197.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M. et al. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // *Seed Sci. Res.* 2019. V. 29. P. 1–9.
- Severtsova E.A., Severtsov A.S. Crucial stages of embryogenesis of *R. arvalis*: Part 1. Linear measurements of embryonic structures // *Russ. J. Dev. Biol.* 2011. V. 42. P. 331–341.
- Severtsova E.A., Severtsov A.S. Crucial stages of embryogenesis of *R. arvalis*: Part 3. Modularity of developmental integrity // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. V. 44. P. 273–278.
- Shen Y., Jiang Z., Yao X. et al. Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation // *PLoS One.* 2012. V. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032237>
- Song J., Xie X., Cui Y., Zou J. Endosperm–embryo communications: Recent advances and perspectives // *Plants.* 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/plants10112511>
- Souèges R. Embryogenie des Graminees, Developpement de l'embryon chez le *Poa annua* L. // *Compt. Rend. Held. Sea. Acad. Sci.* 1924. V. 178. P. 1307–1310.

- Souèges R.* Exposes d'embryologie et de morphologie végétales. X. Embryogène et classification. Deuxieme fascicule: Essai d'un système embryogénique (Partie générale) // *Acta Sci. Industr.* 1939. P. 1–85.
- Sugimoto K., Temman H., Kadokura S., Matsunaga S.* To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019. V. 47. P. 138–150.
- Tai H., Opitz N., Lithio A. et al.* Non-syntenic genes drive RTCS-dependent regulation of the embryo transcriptome during formation of seminal root primordia in maize (*Zea mays* L.) // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 403–414.
- Tian R., Paul P., Joshi S. et al.* Genetic activity during early plant embryogenesis // *Biochem. J.* 2020. V. 477. P. 3743–3767.
- Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N. et al.* Phenomenon of “Siamese embryos” in cereals *in vivo* and *in vitro*: Cleavage polyembryony and fasciations // *Russ. J. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 47. P. 122–137.
- Vasilyeva V.E., Batygina T.B.* Autonomy of the embryo // *Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts.* V. 2. Seed. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA, 2006. P. 375–382.
- Wang Q., Wang M., Chen J. et al.* *ENB1* encodes a cellulose synthase 5 that directs synthesis of cell wall ingrowths in maize basal endosperm transfer cells // *Plant Cell.* 2022. V. 34. P. 1054–1074.
- Wang Y., Yuan J., Wei X. et al.* *GhlBDs* promote callus initiation and act as selectable markers to increase transformation efficiency // *Front. Plant Sci.* 2022a. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.861706>
- Wang Y., He S., Long Y. et al.* Genetic variations in *ZmSAUR15* contribute to the formation of immature embryo-derived embryonic calluses in maize // *Plant J.* 2022b. V. 109. P. 980–991.
- Xiang D., Quilichini T.D., Liu Z. et al.* The transcriptional landscape of polyploid wheats and their diploid ancestors during embryogenesis and grain development // *Plant Cell.* 2019. V. 31. P. 2888–2911.
- Yadav B., Jogawat A., Rahman M.S. et al.* Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review // *Gene Repts.* 2021. V. 23. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yi F., Gu W., Chen J. et al.* High temporal-resolution transcriptome landscape of early maize seed development // *Plant Cell.* 2019. V. 31. P. 974–992.
- Yu K., Feng M., Yang G. et al.* Changes in alternative splicing in response to domestication and polyploidization in wheat // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. P. 1955–1968.
- Yu Y., Zhu D., Ma C. et al.* Transcriptome analysis reveals key differentially expressed genes involved in wheat grain development // *Crop J.* 2016. V. 4. P. 92–106.
- Zheng Y.* Molecular mechanisms of maize endosperm transfer cell development // *Plant Cell Rep.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02807-0>
- Zhao S., Jiang Q., Ma J. et al.* Characterization and expression analysis of *WOX5* genes from wheat and its relatives // *Gene.* 2014. V. 537. P. 63–69.

Critical Stages of Cereal Embryogenesis: Theoretical and Practical Significance

N. N. Kruglova^{1, *}, G. E. Titova², and A. E. Zinatullina¹

¹*Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, pr. Octyabrya, 69, Ufa, 450054 Russia*

²*Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, ul. Professora Popova, 2, St. Petersburg, 197376 Russia*

*e-mail: kruglova@anrb.ru

The problem of critical periods/stages of embryogenesis in flowering plants has been analyzed in detail using a holistic approach that takes into account the importance of morphogenetic and morphophysiological interactions for the development of embryonic structures and surrounding seed and fruit tissues (see publications by T.B. Batygina and V.E. Vasilyeva, 1983–2014). The critical stages of cereal embryogenesis are of particular interest, since the embryos of the Gramineae family representatives are distinguished even among the monocotyledonous plants embryos by the unique Graminad-type embryogenesis and the formation of very specific structures (T.B. Batygina, 1968–2014). The article presents a review of the literature and the author's own data on the periodization of the embryogenesis on the example of cereals, analyzes disputable issues concerning both the criteria for revealing the critical stages of embryogenesis and the features of the critical stages. The prospects of studying the stages of cereals embryogenesis, as well as the use of embryos at the critical developmental stages in biotechnology and breeding research are discussed.

Keywords: plant embryo, embryogenesis, staging, critical stages of development, cereals

УДК 576.5+577.2

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2022 г. А. В. Кузнецова*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия
*e-mail: avkuzn@list.ru

Поступила в редакцию 15.08.2022 г.

После доработки 26.09.2022 г.

Принята к публикации 03.10.2022 г.

Активированные клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека являются основными эффекторными клетками в процессе фиброза, главного патологического проявления пролиферативных витреоретинальных заболеваний сетчатки. При регматогенной отслойке сетчатки покоящиеся клетки РПЭ активируются и приобретают фенотип фибробластоподобных и миофибробластоподобных клеток, которые усиленно пролиферируют и мигрируют в эпиретинальное пространство, где создают благоприятную микросреду для развития фиброза и/или способствуют его прогрессированию. Повышенная сократимость клеток в конечном итоге приводит к тракционной отслойке сетчатки и потере остроты зрения. На сегодняшний день выявлены различные клеточные сигналы, способствующие активации клеток РПЭ, такие как трансформирующий фактор роста бета, фактор роста фибробластов-2, тромбоцитарный фактор роста, митоген-активируемая протеинкиназа, Smads, NF-κB и другие. Следовательно, изучение роли этих факторов и сигнальных путей в активации клеток РПЭ будет способствовать разработке терапевтических стратегий и предоставит новые возможности для терапии заболеваний сетчатки. В обзоре обобщены текущие знания о стимулирующих факторах и сигнальных путях в регуляции клеточных и молекулярных механизмов дедифференцировки и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) клеток РПЭ, которые в значительной степени были определены путем изучения эффектов различных сигнальных молекул *in vitro*. Кроме того, обсуждается роль микроРНК в регуляции сигнального пути TGF-β и ЭМП, а также рассматриваются перспективные терапевтические агенты.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, эпителиально-мезенхимальный переход, TGF-β/BMP сигнальный путь, FGF/FGFR сигнальный путь, WNT сигнальный путь, Notch сигнальный путь, пролиферативная витреоретинопатия

DOI: 10.31857/S0475145022060052

ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой монослой из сильнопигментированных поляризованных клеток, который располагается между фоторецепторами сетчатки и хориокапиллярами сосудистой оболочки глаза. Клетки окончательно дифференцированы и митотически неактивны из-за контактного ингибирования (Chen et al., 2012b). Апоикальная поверхность клеток РПЭ плотно прилегает к наружным сегментам фоторецепторов и компонентам межфоторецепторного матрикса, что способствует сохранению тканевой организации (Finnemann, Chang, 2008). РПЭ выполняет ряд важных функций: посредством плотных контактов участвует в формировании гемато-ретинального барьера, участвует в транспортировке питательных веществ к фоторецепторам, регулировании гомео-

стаза ионов, pH и жидкости в субретинальном пространстве, поглощении световой энергии, удалении свободных радикалов и активных форм кислорода, регенерации зрительного хромософа 11-*cis*-ретиналя, фагоцитировании наружных сегментов фоторецепторов и секреции факторов роста (Strauss, 2005; Samuel et al., 2017).

Воздействие различных повреждающих факторов на задний отдел глаза приводит к активации покоящихся клеток РПЭ. Например, при пролиферативной витреоретинопатии (ПВР), такие повреждающие факторы, как травма глаза, кровоизлияние в стекловидное тело или внутриглазное воспаление способствуют разрыву и регматогенной отслойке сетчатки (Paraguram et al., 2009; Lei et al., 2010). В результате разрыва сетчатки клетки РПЭ подвергаются воздействию компонентов сыворотки крови: факторов роста, ци-

токинов и хемокинов. Физическое отделение нейронов сетчатки от РПЭ и/или воздействие различных внешних растворимых или связанных с мембраной факторов запускает в клетках РПЭ каскад реакций, задействованных в пролиферации, в том числе усиление активности внеклеточной сигнал регулируемой киназы (англ. extracellular-signal-regulated kinase, ERK) (Geller et al., 2001; Yasumuro et al., 2017). Клетки РПЭ сокращают свои поверхностные микроворсинки, ослабляют эпителиальные свойства, такие как апико-базальная полярность, ремоделируют соединительные комплексы и приобретают округлую форму (Sheridan et al., 2005). Коллапс микроворсинок РПЭ и перестройка протеогликанов межфоторецепторного матрикса являются ранними обратимыми ответами на регматогенное отслоение сетчатки (Finnemann, Chang, 2008).

Длительная отслойка сетчатки вызывает дегенерацию наружных сегментов фоторецепторов и, как следствие, апоптозную гибель фоторецепторов (Cook et al., 1995; Geller et al., 2001). Так, в течение 3 дней после отслойки сетчатки погибают примерно 20% фоторецепторов, к 28 дню – более 50% фоторецепторов; в результате гибели клеток высвобождаются ангиогенные и воспалительные факторы роста, которые привлекают больше иммунных клеток из хориоидальной сосудистой сети (Stepp, Menko, 2021). Стойкая отслойка сетчатки приводит к пролиферации мюллеровских глиальных клеток и клеток РПЭ. Клетки РПЭ теряют межклеточные контакты и апикально-базальную полярность, экспрессируют маркеры клеточного цикла, отделяются от мембраны Бруха, пролиферируют и образуют пласты клеток под сетчаткой, называемые субретинальными мембранами (Sheridan et al., 2005; Finnemann, Chang, 2008; Zou et al., 2020). В результате эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) клетки РПЭ трансформируются в веретенообразные клетки, напоминающие фибробласты и макрофаги, которые мигрируют через дефект сетчатки, трансформируются в миофибробласты и аномально секретируют матриксные металлопротеиназы (англ. matrix metalloproteinases, MMPs), тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (англ. tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs) и белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Трансформированные клетки РПЭ наряду с ретинальной глией и истинными фибробластами на внутренней поверхности отслоенной сетчатки и внутри стекловидного тела образуют листы рубцовой ткани, известные как эпиретинальные мембраны (Sheridan et al., 2005; Zou et al., 2020). Факторы сыворотки крови из поврежденных и негерметичных кровеносных сосудов также высвобождаются в стекловидное тело (Stepp, Menko, 2021). Протеомное исследование 200 цитокинов и хемокинов в стекловидном теле пациентов с ПВР показало их превали-

рование у пациентов с ранней стадией (А, В) над поздней (С, D) (Roibal et al., 2018). Сокращение фиброзных периретинальных мембран приводит к тракционной отслойке сетчатки и потере остроты зрения (Chung et al., 2011; Huang et al., 2012; Zhu et al., 2013; Fuhrmann et al., 2014).

В патогенезе возрастной макулярной дегенерации (ВМД), основной причины необратимой центральной потери зрения среди пожилых людей, ключевую роль, как известно, играют воспалительные процессы и окислительный стресс (Ambati, Fowler, 2012; Ambati et al., 2013; Kauppinen et al., 2016). При воспалении, лимфоциты и макрофаги, инфильтрирующие заднюю часть глаза, секретируют провоспалительные цитокины, такие как TNF α , IL-1 β и IFN γ , которые активируют сигнальные пути в клетках РПЭ, что приводит к дисфункции и гибели РПЭ (Kutty et al., 2016). Как показал транскриптомный (scRNA-seq) и протеомный анализ клеток РПЭ, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs), у пациентов с географической атрофией, поздней стадией ВМД, выявляются нарушения в митохондриальных функциях, метаболических путях и реорганизации ВКМ (Senabouth et al., 2022). Клинические данные, свидетельствующие о том, что клетки РПЭ подвергаются ЭМП при ПВР и ВМД, обсуждены в обзоре Жоу и соавт. (Zhou et al., 2020).

Таким образом, ЭМП клеток РПЭ и функциональная дегенерация этих клеток способствуют развитию ряда заболеваний сетчатки (Friedlander, 2007; Kauppinen et al., 2016; Huang et al., 2017; Ghosh et al., 2018; Shu et al., 2020; Zou et al., 2020). Потенциальным методом лечения влажной формы ВМД на сегодняшний день является замена неблагополучного РПЭ здоровым эпителием. Некоторые исследования продемонстрировали успешное получение зрелых РПЭ из различных линий эмбриональных стволовых клеток (ESC) и iPSCs человека (Schwartz et al., 2012; Luo, Chen, 2018; Kashani et al., 2018). Однако применение РПЭ для заместительной клеточной терапии в современных клинических подходах чревато его трансформацией в фибробластоподобные клетки, что является фактором риска развития ПВР (Kole et al., 2018). В связи с этим исследование механизмов активации, дедифференцировки и ЭМП клеток РПЭ приобретает первостепенное значение (Kole et al., 2018).

На сегодняшний день считается, что мастер-регулятором профибротических процессов на молекулярном уровне является трансформирующий фактор роста бета (англ. transforming growth factor beta, TGF- β) (Parapuram et al., 2009; Dvashi et al., 2015; Tosi et al., 2018b). TGF- β сверхэкспрессируется в стекловидном теле пациентов с пролиферативными витреоретинальными заболеваниями

ями, а также обнаруживается в сократительных мембранах, в состав которых входят трансформированные клетки РПЭ (Connor et al., 1989; Baudouin et al., 1993; Kita et al., 2007a).

В отличие от TGF- β , действующего на фибробластоподобные клетки и стимулирующего их трансформацию в миофибробласты, белки семейства костных морфогенетических белков (англ. bone morphogenetic protein, BMP) стимулируют в мезенхимальных клетках мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) (Choudhary et al., 2015), необходимый для возвращения РПЭ в исходное стабильное состояние после пролиферации (Cascio-Robles et al., 2016). При патологии баланс между ЭМП и обратным переходом может нарушаться за счет повышения уровня TGF- β , что приводит к развитию фиброзных нарушений. Таким образом, средства, способные ингибировать ЭМП клеток РПЭ, могут иметь большое терапевтическое значение для профилактики ПВР после отслойки сетчатки или активного развития хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при влажной ВМД. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе запуска ЭМП, и важность TGF- β среди других различных факторов остаются неясными и их еще предстоит уточнить. В обзоре рассмотрена роль TGF- β /BMP и других сигнальных путей, включая путь фактора роста фибробластов-2 (англ. fibroblast growth factor-2, FGF2), Wnt и Notch в регуляции клеточных и молекулярных механизмов дедифференцировки и ЭМП клеток РПЭ, которые в значительной степени были определены путем изучения эффектов различных сигнальных молекул *in vitro*. Кроме того, обсуждается роль микроРНК в регуляции сигнального пути TGF- β и ЭМП, а также рассматриваются стратегии нацеливания на TGF- β сигнальный путь.

ПРИЗНАКИ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КЛЕТКАХ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ *IN VITRO*

Моделирование ПВР *in vitro* может привести к пониманию развития ЭМП в клетках РПЭ, а также роли регуляторов транскрипции и сигнальных путей в этом процессе. Культуры клеток РПЭ дают широкие возможности для исследования механизмов патологических процессов *in vivo* и путей их регуляции на клеточном и молекулярном уровнях. Клетки РПЭ *in vitro* в зависимости от условий могут менять свой дифференцировочный статус, переходя из состояния эпителиальной дифференцировки в дедифференцированное состояние и обратно (Kuznetsova et al., 2014). В ряде исследований *in vitro* показано, что потеря межклеточного контакта в клетках РПЭ инициирует дедифференцировку: клетки теряют пигментацию, пролиферируют, теряют экспрессию эпителиальных

маркеров и, наоборот, экспрессируют не характерные для РПЭ маркеры, что приводит к изменению фенотипа клеток (Vinores et al., 1993; Amemiya et al., 2004; Engelhardt et al., 2005; Kuznetsova et al., 2011; Milyushina et al., 2011; Chung et al., 2011; Salero et al., 2012; Fuhrmann et al., 2014; Chiba, 2014).

В прекофлюэнтных клетках РПЭ *in vitro* под влиянием различных компонентов сывроточной среды снижается экспрессия таких эпителиальных маркеров, как E-кадгерина, zonula occludens 1 (ZO-1), окклюдина и цитокератинов, а также снижается экспрессия специфических генов РПЭ (например, *RPE65*, *RLBP1 (CRALBP)*, *BEST1*, *MITF*, *OTX2*) (Salero et al., 2012) и повышается уровень мезенхимальных маркеров, таких как виментин, N-кадгерин, фибронектин, коллаген I типа, MMP2, MMP9, ламинин, что характерно для развития ЭМП (Mitsuhiro et al., 2003; Lee et al., 2008; Li et al., 2011).

Помимо экспрессии мезенхимальных маркеров, клетки РПЭ *in vitro* экспрессируют нейральные/ретиальные маркеры, например, нестин, β III-тубулин (кодируется геном *TUBB3*), ассоциированный с микротрубочками белок 1B (англ. microtubule associated protein 1B, MAP1B), MAP5, нейрофиламенты 200 кДа (англ. 200-kDa neurofilaments, NF200), Hes1, Musashi, глиальный фибриллярный кислый белок (англ. glial fibrillary acidic protein, GFAP), PAX6 (Vinores et al., 1993; Amemiya et al., 2004; Engelhardt et al., 2005; Kuznetsova et al., 2011; Milyushina et al., 2011; Chung et al., 2011; Salero et al., 2012). Эти нейральные/ретиальные маркеры отсутствуют в нормальных клетках РПЭ *in situ* (Vinores et al., 1993; Katsetos et al., 2003; Martínez-Morales et al., 2004; Osumi et al., 2008).

К сожалению, очень мало известно об экспрессии нейральных/ретиальных маркеров клетками РПЭ при патологических состояниях *in vivo*. Только в одном исследовании сообщается об экспрессии β III-тубулина, белка микротрубочек, в патологических клетках РПЭ, обнаруживаемых в идиопатических эпиретинальных мембранах и эпиретинальных мембранах при ПВР и пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) (Vinores et al., 1995). Однако нейральные маркеры иногда обнаруживают и в некоторых других ненейрональных тканях, включая семенники, плаценту, тонкий и толстый кишечник (Person et al., 2017). Так, например, сверхэкспрессия β III-тубулина показана при широком спектре видов рака, а именно при раке легких, аденокарциноме поджелудочной железы, почечно-клеточном раке и злокачественной меланоме, что связано с плохим ответом на противоопухолевые препараты, нацеленные на связывание β -тубулина, изменение динамики микротрубочек и блокирование клеточ-

ного деления (Person et al., 2017). Кроме того, экспрессия нестина выявлена в клетках макроглии (клетках Мюллера) на модели дегенеративного заболевания сетчатки у мышей (Moon et al., 2017a).

В то же время, индукторами нейрональной дифференцировки считаются ретиноевая кислота (англ. retinoic acid, RA), продукт метаболизма витамина А, и FGF2, хотя их пути в нейрогенезе являются взаимно ингибирующими (del Cortal et al., 2003). В связи с этим FGF2, RA и другие ретиноиды рассматриваются некоторыми исследователями в качестве стимуляторов трансдифференцировки РПЭ в нейрноподобные клетки (Opas, Dziak, 1994; Carr et al., 2011; Khera et al., 2012). Например, обработка клеток ARPE-19, широко используемой клеточной линии РПЭ взрослого человека, фенретинидом (англ. Fenretinide), синтетическим производным витамина А, изменяла морфологию клеток. Изменения заключались в появлении нейрноподобных отростков и сопровождались подавлением экспрессии РПЭ-специфических генов (*OTX2* и *MITF*) и повышением экспрессии нейрональных/ретиальных маркеров (кальбиндина и кальретинина) (Lueck et al., 2017; Lueck et al., 2020). Однако такое лечение на самом деле не превращает клетки РПЭ в нейроны (Khera et al., 2012). Экспрессия в клетках РПЭ нейральных/ретиальных маркеров и потеря РПЭ-специфических маркеров скорее подразумевает, что в культуре клетки РПЭ, имеющие нейроэпителиальное происхождение, предрасположены к ретиальному состоянию, подобному предшественникам (Carr et al., 2011) и, по всей видимости, свидетельствует о перестройке цитоскелета и дедифференцировке этих клеток. Кроме того, *in vitro* клетки РПЭ не теряют полностью свои эпителиальные признаки. Эта предполагаемая пластичность свидетельствует о задержке клеток РПЭ на промежуточных стадиях и частичном ЭМП, что наблюдается во время эмбрионального развития, заживлении ран и раке (Nieto et al., 2016; Zhou et al., 2020).

TGF- β /VMP СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

Суперсемейство TGF- β у млекопитающих объединяет четыре семейства близких по структуре сигнальных белков: TGF- β , VMP, семейство факторов роста и дифференцировки (англ. growth/differentiation factors, GDFs) и семейство активинов и ингибинов, всего более 30 членов (Yang et al., 2014; Tosi et al., 2018b).

В семействе VMP, основываясь на гомологии последовательностей и известных функциях, выделяют четыре подгруппы: VMP2/4, VMP5/6/7/8a/8b, VMP9/10 и VMP12/13/14. Всего в семействе VMP у человека идентифицировано 20 членов (Bragdon et al., 2011). VMP1, хотя и назван костным морфо-

генетическим белком, в семейство VMPs не входит. О VMP1 (другое название С-протеиназа проколлагена) известно, что он расщепляет проколлагены и индуцирует накопление ВКМ. Кроме того, VMP1 может быть активатором VMPs, поскольку он высвобождает активные VMPs из неактивных комплексов путем расщепления Chordin, антагониста VMPs. VMP1 также расщепляет латентный белок, связывающий TGF- β , что приводит к последующей активации латентного TGF- β металлопротеиназами, например, MMP2 (Miyazono, Shimanuki, 2008; Yang et al., 2014).

В семействе TGF- β у млекопитающих описано три изоформы: TGF- β 1, 2, 3 (Tosi et al., 2018b). Вновь синтезированный TGF- β секретируется из клеток в виде неактивного комплекса, называемым большим латентным комплексом (англ. large latent complex, LLC), что предотвращает связывание TGF- β с его рецепторами. Большой латентный комплекс, помимо самого TGF- β , содержит latency associated peptide (LAP) и latent TGF- β -binding protein (LTBP). Выделение активного TGF- β из латентной формы происходит при активации. Активаторами латентного TGF- β являются изменение pH среды (закисление или защелачивание), кислоты (соляная кислота), активные формы кислорода, протеазы (плазмин, MMP2, MMP9), α V интегрин клеточной поверхности и адгезивные гликопротеины (тромбоспондин-1, англ. thrombospondin-1) (Robertson, Rifkin, 2016).

Различные формы (латентная, активная) и изоформы TGF- β 1, 2, 3 обнаруживаются в норме в разных структурах заднего сегмента глаза. При этом их распределение неоднородно (Lutty et al., 1993; Anderson et al., 1995; Tosi et al., 2018b; Tosi et al., 2018a). TGF- β 1 выявлен в наружных сегментах фоторецепторов, ганглиозных клетках, микроглии, эндотелии хориокапилляров, гладкомышечных клетках и перицитах поверхностных кровеносных сосудов сетчатки и гиалоцитах стекловидного тела (Anderson et al., 1995; Tosi et al., 2018b). TGF- β 2 локализуется в клетках РПЭ (вблизи латеральных границ), наружном сегменте фоторецепторов, микроглии, соединительной ткани крупных сосудов хориоидеи, строме хориоидеи, гладкомышечных клетках и перицитах поверхностных сосудов сетчатки и гиалоцитах стекловидного тела. TGF- β 3 обнаружен в клетках РПЭ (апикально), митохондриях фоторецепторов, микроглии, клетках Мюллера, гиалоцитах стекловидного тела и хориоидальных гистиоцитах (Anderson et al., 1995; Tosi et al., 2018b).

Только во внутриглазной жидкости и гиалоцитах стекловидного тела идентифицированы все три изоформы TGF- β (табл. 1) с преобладанием как активной, так и латентной TGF- β 2 изоформы (Lutty et al., 1993; Tosi et al., 2018a). Около 87% витреального TGF- β находится в латентной фор-

Таблица 1. Определение различных факторов в образцах стекловидного тела (аспиратах) и срезах криоконсервированных задних сегментов глаз

Фактор	Название	Полное название	Метод определения	Заболевание сетчатки	Ссылка	
Фактор роста	TGF- β 1	Трансформирующий фактор роста-бета 1 (англ. transforming growth factor beta 1)	Радиорецепторный анализ	Отслойка сетчатки (ОС); пролиферативная витреоретинопатия (ПВР)	(Connor et al., 1989)	
	TGF- β 2	Transforming growth factor beta 2	Иммуногистохимия (ИГХ)	Глаза из глазного банка	(Lutty et al., 1993)	
			ИГХ	ПВР	(Baudouin et al., 1993)	
	TGF- β 2	Transforming growth factor beta 2	Радиорецепторный анализ	Отслойка сетчатки (ОС); пролиферативная витреоретинопатия (ПВР)	(Connor et al., 1989)	
			Иммуноферментный анализ (ИФА)	ОС; ПВР; пролиферативная диабетическая ретинопатия (ПДР)	(Kita et al., 2007a)	
	TGF- β 3	Transforming growth factor beta 3	ИГХ	Глаза из глазного банка	(Lutty et al., 1993)	
			ИГХ	Глаза из глазного банка	(Lutty et al., 1993)	
	FGF	Фактор роста фибробластов (англ. fibroblast growth factor)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин (англ. multiplex bead analysis)	ПВР	(Vanejee et al., 2007)	
	FGF1	Фактор роста фибробластов-1 (англ. fibroblast growth factor-1)		ИГХ	ПВР	(Baudouin et al., 1993)
	FGF2	Фактор роста фибробластов-2 (англ. fibroblast growth factor-2)		ИФА	ОС; ПВР	(La Heij et al., 2002)
	EGF	Эпидермальный фактор роста (англ. epidermal growth factor)		ИГХ	ПВР	(Baudouin et al., 1993)
	IGF-1	Инсулиноподобный фактор роста 1 (англ. insulin-like growth factor 1)		ИГХ	ПВР	(Baudouin et al., 1993)
	PDGF	Тромбоцитарный фактор роста (англ. platelet-derived growth factor)	Анализ нейтрализации (англ. neutralization assay)	ОС; ПВР стадии А, В и С	(Hardwick et al., 1997)	
Анализ нейтрализации			ОС; ПВР стадии А, В и С	(Hardwick et al., 1997)		
HGF	Фактор роста гепатоцитов (англ. hepatocyte growth factor)		ИФА	ПДР	(Katsura et al., 1998)	

Таблица 1. Продолжение

Фактор	Название	Полное название	Метод определения	Заболевание сетчатки	Ссылка
Фактор роста	CTGF	Фактор роста соединительной ткани (англ. connective tissue growth factor)	ИФА	ОС; ПВР; ПДР	(Kita et al., 2007a)
	VEGF	Фактора роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor)	ИФА	ПДР	(Katsura et al., 1998)
			ИФА	ПДР	(Hernández et al., 2001)
Цитокин	TNF α	Фактор некроза опухоли альфа (англ. tumor necrosis factor alpha)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Banerjee et al., 2007)
			ИФА	ОС, ПВР; ПДР	(Kita et al., 2007b)
	IL-1 α , IL-1 β	Интерлейкин 1 (англ. interleukin 1)	RT-PCR; ИФА	ПВР	(El-Ghrably et al., 2001)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР	(Banerjee et al., 2007)
			RT-PCR; ИФА	ПВР	(El-Ghrably et al., 2001)
	IL-6	Интерлейкин 6 (англ. interleukin 6)	RT-PCR; ИФА	ПВР	(El-Ghrably et al., 2001)
			ИФА	ОС; ПВР	(La Heij et al., 2002)
	IL-10	Интерлейкин 10 (англ. interleukin 10)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Banerjee et al., 2007)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР	(Banerjee et al., 2007)
	IL-12	Интерлейкин 12 (англ. interleukin 12)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	

Таблица 1. Окончание

Фактор	Название	Полное название	Метод определения	Заболевание сетчатки	Ссылка
Цитокин	IFN γ	Интерферон гамма (англ. interferon γ)	RT-PCR; ИФА	ПВР	(El-Ghrably et al., 2001)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР	(Banejee et al., 2007)
Хемокин	G-CSF	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (англ. granulocyte-stimulating factor)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР	(Banejee et al., 2007)
			RT-PCR; ИФА	ПВР	(El-Ghrably et al., 2001)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Banejee et al., 2007)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Banejee et al., 2007)
miRNAs	CCL2 (также известный как MCP-1)	C-C motif ligand 2 (Monocyte chemo-tactic protein 1)	Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Banejee et al., 2007)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПДР	(Banejee et al., 2007)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПВР; ПДР	(Usui-Ouchi et al., 2016)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ПДР	(Hernández et al., 2001)
			Мультиплексный анализ с использованием магнитных бусин	ОС; ПВР	(La Heij et al., 2002)
Другое	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	ИФА	ПДР	(Hernández et al., 2001)
			miR21	ПВР; ПДР	(Usui-Ouchi et al., 2016)
Другое	GS	Глутаминсинтаза (англ. glutamine synthetase)	ИФА	ОС; ПВР	(La Heij et al., 2002)
			MicroRNA array	ПВР; ПДР	(Usui-Ouchi et al., 2016)

ме, при этом витреальный TGF- β 1 определяется только в латентной форме (Tosi et al., 2018b). Отсутствие TGF- β 2, но не TGF- β 1 или TGF- β 3, нарушает морфогенез эмбриональных глаз у мышей, что определяет превалирующую роль TGF- β 2 в глазу (Sanford et al., 1997).

In vitro в нетрансформированных клетках РПЭ взрослого человека также, как и во внутриглазном теле, показана преобладающая экспрессия TGF- β 2 над TGF- β 1 и TGF- β 3, тогда как в SV40-трансформированных фетальных клетках РПЭ человека – превалирующая экспрессия TGF- β 1 над TGF- β 3 при отсутствии экспрессии TGF- β 2 (Kvanta, 1994). Кроме того, показано, что экспрессия и секреция TGF- β в клетках РПЭ регулируется наличием или отсутствием экзогенных факторов, а также пролиферативной активностью самих клеток РПЭ. При снижении пролиферации и увеличении количества dormantных клеток РПЭ отмечается увеличение уровня секреции TGF- β (Kvanta, 1994).

Белки семейств TGF- β и BMP активируют сходный нисходящий канонический Small mother against decapentaplegic (Smad) и неканонические сигнальные пути.

Канонический TGF- β сигнальный путь/TGF- β /Smad-зависимый сигнальный путь

Каждый лиганд семейства TGF- β связывается со специфической парой рецепторных серин/треонин протеинкиназ, принадлежащих к рецепторам I и II типа, оба из которых необходимы для трансдукции сигнала (рис. 1). Так факторы роста TGF- β связываются с TGF β R-I (другое название *activin receptor-like kinase 5*, ALK5) и TGF β R-II, а белки семейства BMP – с BMPR-I (BMPR-IA/ALK3, BMPR-IB/ALK6) и BMPR-II рецепторами. Соединение лиганда с рецептором II типа приводит к связыванию рецепторов I и II типа. В этом комплексе рецептор II типа вызывает фосфорилирование и активацию рецептора I типа. Рецептор I типа затем фосфорилирует рецептор-активируемые белки Smads: Smad2 и Smad3 в TGF- β сигнальном пути и Smad1, Smad5 и Smad8 в BMP сигнальном пути (Mitsuhiro et al., 2003; Xu et al., 2009). Фосфорилированные рецепторные белки Smads формируют гетеромерные комплексы с общим белком Smad4, и транслоцируются в ядро, где они взаимодействуют с ДНК-связанными транскрипционными факторами семейств SNAIL, zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB) и basic helix-loop-helix (bHLH), которые регулируют ЭМП, активируя экспрессию генов мезенхимальной дифференцировки и подавляя экспрессию генов эпителиальной дифференцировки. ZEB1 и ZEB2 (также известный как SIP1) являются критическими транскрипционными факторами, репрессирующими экспрессию эпи-

телиальных генов для запуска ЭМП. Показано, что избыточная экспрессия ZEB1 в первичных культурах РПЭ мыши приводит к ЭМП (Liu et al., 2010).

Сигнальные белки семейства TGF- β оказывают регуляторное влияние на ЭМП и могут обратить этот процесс вспять во время эмбрионального развития и нормального заживления ран. Однако повышение уровня TGF- β приводит к нарушению баланса между ЭМП и обратным переходом при патологических состояниях, таких как хроническое воспаление, что приводит к развитию фиброзных нарушений (Xu et al., 2009).

TGF- β и его посредник фактор роста соединительной ткани (англ. connective tissue growth factor, CTGF) – индукторы синтеза и аккумуляции белков ВКМ (фибронектина, ламинина, коллагена I типа) – являются ключевыми медиаторами в развитии ПВР и в трансформации РПЭ в фибробластоподобные клетки *in vitro* (Grisanti, Guidry, 1995; Zhu et al., 2013). При ПВР в аспиратах стекловидного тела с интраокулярным фиброзом содержится более чем в три раза больше TGF- β по сравнению с неосложненными формами отслоения сетчатки без интраокулярного фиброза (Connor et al., 1989). Кроме того, при ПВР в эпиретинальных мембранах наблюдается активация экспрессии Snail (SNAIL) (Li et al., 2011).

Обработка клеток РПЭ взрослого человека ранних пассажей стекловидным телом приводит к увеличению экспрессии мезенхимальных маркеров, а именно фибронектина и альфа-гладкомышечного актина (англ. alpha-smooth muscle actin, α SMA) (Huang et al., 2012). Воздействие TGF- β 1 и CTGF на клетки ARPE-19 способствует схожим изменениям. В клетках увеличивается экспрессия таких компонентов ВКМ, как фибронектина, ламинина, MMP2 и коллагена I типа, что сопровождается снижением экспрессии E-кадгерина и ZO-1, а также усилением экспрессии Snail, как мРНК, так и белка. В самих клетках при этом происходит реорганизация цитоскелета: клетки экспрессируют α SMA и приобретают мезенхимальный фенотип (Lee et al., 2008; Li et al., 2011; Zhu et al., 2013). Подавление Snail значительно ослабляет TGF- β 1-индуцированный ЭМП, что выражается в уменьшении экспрессии мезенхимальных маркеров (фибронектина, α SMA) и повышением эпителиальных маркеров (E-кадгерина, ZO-1) (Li et al., 2011).

TGF- β и активин А, кроме реорганизации цитоскелета, стимулируют миграцию клеток линии РПЭ человека D407 (линия получена из глазного яблока 12-летнего ребенка), которая происходит через TGF- β /Smad-зависимый сигнальный путь (Mitsuhiro et al., 2003). Нокдаун Snail приводит к эффективному подавлению миграции клеток ARPE-19 (Li et al., 2011). Таким образом, Snail также

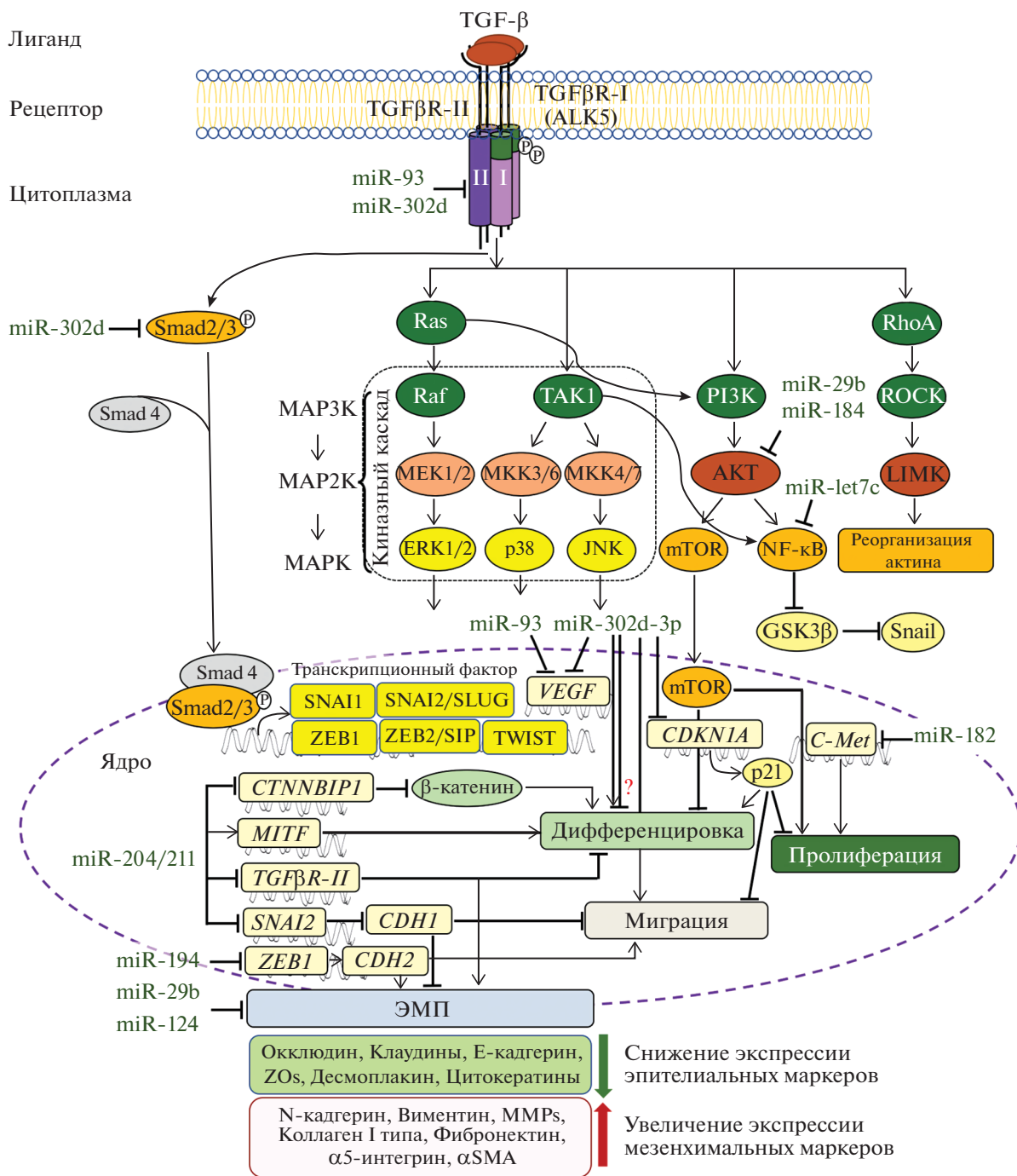


Рис. 1. miRNAs в регуляции TGF-β сигнальных путей и контроле ЭМП при пролиферативных витреоретинальных заболеваниях. ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; ALK5 – активин рецептор-подобная киназа 5 (англ. activin receptor-like kinase 5, другое название – TGF-β рецептор I типа, англ. TGFβR-I – TGF-β-рецептор I); JNK – c-Jun N-терминальная киназа (англ. c-Jun N-terminal kinase); MEK или MKK – другие названия MAPK kinase; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinases); P указывает на фосфорилирование. См. текст для других сокращений.

как и ZEB1 играет важную роль в TGF-β1-индуцированном ЭМП клеток РПЭ человека и может способствовать развитию ПВР. Специфическое ингибирование Snail может обеспечить новый подход к лечению и предотвращению ПВР.

Во многих работах, выполненных на нокаутных животных, показана существенная роль белков семейства BMP, в частности BMP4 и 7, в морфогенезе глаза (Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995; Furuta, Hogan, 1998) и специализации РПЭ

(Wordinger, Clark, 2007; Müller et al., 2007). Более подробно механизм передачи сигналов белков семейства BMP – от регуляции секреции, локализации и активации рецепторов до влияния на передачу сигналов – описан в обзоре Брэгдон и соавт. (Bragdon et al., 2011). Однако информации о роли белков BMP и его рецепторах во взрослом РПЭ в норме и патологии существует мало. Матхура и соавт. впервые определили экспрессию мРНК BMP4 и BMPR-II в свежесекретированных клетках РПЭ, в первичных культурах взрослого человека и постоянной линии ARPE-19 (Mathura et al., 2000). Авторами показано также, что экзогенное добавление BMP4 и BMP2 к культивируемым клеткам РПЭ ингибирует их пролиферацию. В последующих работах выявлено, что BMP4 дифференциально экспрессируется в макулярной области РПЭ пациентов с сухой и влажной ВМД, что зависит от микроокружения (Xu et al., 2011). Так при сухой форме ВМД отмечается увеличение экспрессии BMP4, а при влажной – снижение или даже отсутствие белка на иммуногистохимическом уровне в хирургически удаленных хориваскулярных мембранах (Zhu et al., 2009a). При сухой форме ВМД, по мнению авторов, BMP4 опосредует окислительный стресс-индуцированное старение РПЭ и отвечает за повышенное содержание в них белка p53 (Zhu et al., 2009b). При влажной ВМД, как показано на модели CNV, вызванной лазерным повреждением сетчатки у мышей, уровень BMP4 обратно коррелирует с уровнем основного плейотропного воспалительного цитокина TNF α (Xu et al., 2011). Данный факт указывает на то, что TNF α ингибирует экспрессию BMP4 в клетках РПЭ во время активного развития CNV. Кроме того, добавление TNF α значительно снижало экспрессию BMP4 в культивируемых фетальных клетках РПЭ человека, ARPE-19 и клетках РПЭ в эксплантатах задней чаши глаза мыши (Xu et al., 2011). Таким образом, механизм подавления BMP4, выявленный Сюй и соавт., может быть полезным для определения новых мишеней для лечения ВМД.

Важную роль BMP белков в подавлении фиброза при ПВР показывают работы с использованием их антагонистов. Так, греmlin (англ. gremlin), один из антагонистов BMP белков, способствовал ЭМП в клетках ARPE-19, на что указывает повышение экспрессии α SMA и активности MMP2, подавление экспрессии ZO-1 и повышенная миграционная способность клеток (Lee et al., 2007). В дополнение к этому, недавние исследования демонстрируют важную роль BMP4 и BMP7 в подавлении фиброза при ПВР (Yao et al., 2016, 2019). Так, добавление экзогенных BMP4 и BMP7 к первичным клеткам РПЭ ингибировало TGF- β -индуцированное подавление эпителиальных маркеров (ZO-1, E-кадгерина (кодируется геном CDH1)), а также активацию мезенхимальных маркеров (фибронектин,

α SMA) как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Кроме того, обработка BMP4 ослабляла вызванное TGF- β сокращение коллагенового геля, миграцию клеток и фосфорилирование Smad2/3. Напротив, нокдаун эндогенного BMP4 стимулировал изменения в маркерах ЭМП (Yao et al., 2016, 2019). Результаты Yao и соавт. свидетельствуют о том, что BMP4 и BMP7 могут ингибировать TGF- β -опосредованный ЭМП в клетках РПЭ и, таким образом, их можно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических агентов для лечения ПВР.

Неканонические TGF- β сигнальные пути

Помимо канонического TGF- β /Smad-зависимого сигнального пути выделяют также Smad-независимые сигнальные каскады, которые активируются в ответ на TGF- β (рис. 1).

Сигнальные каскады митоген-активируемой протеинкиназы (англ. mitogen-activated protein kinase, MAPK). На сегодняшний день у млекопитающих идентифицировано 14 членов MAPK, которые разделены на 7 подгрупп. Выделяют четыре обычные подгруппы MAPK (ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK и ERK5), работающие в типичном трехуровневом модуле с двойным фосфорилированием, и три атипичных подгруппы MAPK (ERK3/4, ERK7/8 и pemo-like kinase (NLK)), которые не следуют классической трехуровневой сигнальной структуре с двойным фосфорилированием (Yue, López, 2020). MAPK играют ключевую роль в преобразовании внеклеточных стимулов в широкий спектр клеточных ответов, включая рост, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток (Nishimoto, Nishida, 2006). В зависимости от типа клеток и стимула MAPK могут действовать как активаторы или ингибиторы клеточных ответов (Yue, López, 2020).

ERK1/2 каскады стимулируются в основном факторами роста, тогда как JNK и p38 MAPK активируются наиболее заметно после воздействия на клетки факторов (физических, химических и биологических), вызывающих стресс. Активируемые стрессом JNK и p38 MAPK играют ключевую роль в балансировании выживания и гибели клеток.

MAPK/ERK сигнальный каскад наиболее изучен среди MAPK каскадов. На клеточной культуре РПЭ мыши показано, что TGF- β активирует белок Ras (Chung et al., 2011), который участвует в различных MAPK каскадах передачи информации от рецепторов плазматической мембраны к ядерным факторам транскрипции (рис. 1). В клетках РПЭ в течении ЭМП ERK1/2 сигнальный путь может перекрестно взаимодействовать с каноническим TGF- β /Smad и Jagged/Notch путя-

ми. Так, в клетках ARPE-19 инактивация ERK1/2 с помощью U0126, низкомолекулярного ингибитора фосфорилирования MEK1/2 (mitogen extracellular signal regulated kinases 1/2), предотвращала TGF- β 2-индуцированное подавление Р-кадгерина и активацию α SMA, коллагена IV типа, N-кадгерина и фибронектина путем ингибирования как канонического TGF- β 2/Smad, так и Jagged/Notch сигнальных путей. Кроме того, блокада Notch пути специфическим ингибитором DAPT подавляла индуцированную TGF- β 2 активацию пути ERK1/2 (Chen et al., 2014a). В другом исследовании, напротив, активация ERK1/2 сигнального пути с помощью кемпферола (англ. kaempferol), флавоноида с противораковой и антиметастатической активностью, ингибировала экспрессию белка MMP2 и миграцию клеток ARPE-19 (Chien et al., 2019).

Ras-ERK сигнальный путь, помимо индукции мезенхимальной дифференцировки, может участвовать в регуляции нейрональной дифференцировки клеток РПЭ (Chung et al., 2011). При добавлении TGF- β в среду культивирования клеток РПЭ мыши в последних отмечено усиление экспрессия нейрон-ассоциированных генов, в частности *TUBB3* (Chung et al., 2011). В то время как, при предобработке клеток U0126 эффективно блокировалось TGF- β -вызванное фосфорилирование ERK и значительно уменьшалась экспрессия *TUBB3*. Данный факт указывает на то, что TGF- β стимулирует экспрессию *TUBB3* через активацию MAPK/ERK сигнального пути. Результаты работы этих авторов согласуются с данными литературы, свидетельствующими об участии MAPK/ERK сигнального пути в трансдифференцировке РПЭ в нейральную сетчатку у куриного эмбриона (Galy et al., 2002). Так в сетчатке куриного эмбриона *in ovo* эктопическая экспрессия аллели MEK1 (MEK^{DD}), непосредственного активатора ERK в MAPK сигнальном пути, вызывала трансдифференцировку РПЭ в клетки подобные нейроэпителиальному слою сетчатки, что коррелировало с ингибированием экспрессии *Mif* в презумптивном РПЭ (Galy et al., 2002). Следовательно, TGF- β через активацию MAPK/ERK сигнального каскада индуцирует и нейрональную и мезенхимальную дифференцировку клеток РПЭ, т.е. их дедифференцировку и ЭМП.

Известно, что в регуляции JNK и p38 MAPK сигнальных каскадов участвует член семейства MAPK киназ-киназ – TGF- β -активированная киназа 1 (англ. TGF- β -activated kinase 1, TAK1, альтернативное имя MAPK kinase kinase 7, MAP3K7) (рис. 1).

В ряде работ, выполненных на линейных клетках РПЭ человека, выявлено участие протеинкиназы p38 MAPK в ЭМП (Saika et al., 2005; Dvashi

et al., 2015). Так, использование 5Z-7-оксозеенола, ингибитора TAK1, предотвращало развитие признаков ЭМП, вызванных стимуляцией TGF- β 1: миграцию клеток, увеличение экспрессии α SMA и сократительной способности клеток ARPE-19 (Dvashi et al., 2015). В другой работе ингибирование p38 MAPK специфическим ингибитором SB202190 препятствовало стимулирующему действию экзогенного TGF- β 2 на миграцию клеток ARPE-19 и на продукцию компонентов ВКМ, такие как коллаген I типа и фибронектин (Saika et al., 2005).

PI3K/АКТ/мTOR сигнальный путь. Доказательства того, что TGF- β активирует не только MAPK, но и фосфоинозитид-3-киназный (англ. phosphoinositide 3-kinase, PI3K) сигнальный каскад (рис. 1) находятся в работах Ли и соавт. (Lee et al., 2008) и Хуанг и соавт. (Huang et al., 2012). Они свидетельствуют об увеличении фосфорилирования не только ERK1/2, но и нижестоящей мишени PI3K – АКТ (протеинкиназа В, кодируемая АКТ), после воздействия TGF- β 1 на клетки РПЭ человека. Нижестоящей мишенью АКТ является белок механическая мишень рапамицина (англ. mechanistic (formerly “mammalian”) target of rapamycin, mTOR), который регулирует трансляцию многих белков, в том числе тех, которые связаны с ростом клетки и ее размножением. mTOR представляет собой серин/треониновую протеинкиназу из семейства PI3K-родственных киназ (англ. PI3K-related kinase, PIKK), которая образует каталитическую субъединицу двух различных белковых комплексов, известных как mTOR комплекс 1 (англ. mTOR complex 1, mTORC1) и 2 (mTORC2) (Saxton, Sabatini, 2017). Если mTORC1 регулирует рост и метаболизм клеток, способствуя синтезу белков, липидов и нуклеотидов, одновременно подавляя катаболические пути, такие как аутофагия, то mTORC2 контролирует пролиферацию и выживание (Saxton, Sabatini, 2017).

Исследования по ингибированию mTORC1 сигнального пути в культурах клеток РПЭ ведутся с целью регуляции ЭМП. Так, использование рапамицина, ингибитора mTORC1, способствовало снижению в клетках ARPE-19, обработанных TGF- β 1, экспрессии NADPH oxidase 4 (NOX4) (Kim et al., 2020). Ингибирование NOX4 в клетках ARPE-19 предотвращало образование активных форм кислорода, TGF- β -индуцированного ЭМП и фиброза. Интересно, что обработка рапамицином полностью блокировала фосфорилирование ERK1/2, указывая на ингибирование петли обратной связи от mTORC1 к ERK1/2. Авторы предполагают, что ось TGF- β 1/ERK1/2/mTORC1/NOX4 может быть использована в качестве новой стратегической мишени для предотвращения заболеваний сетчатки, связанных с ЭМП и фиброзом (Kim et al., 2020).

Дедифференцировка клеток РПЭ, опосредованная активацией mTOR в ответ на химическое окислительное повреждение, блокировалась рапамицином в эксперименте на мышцах с селективной по отношению к РПЭ постнатальной потерей окислительного фосфорилирования. Ингибирование реакции на стресс путем блокирования активации mTOR оказывало заметное благотворное влияние не только на РПЭ, но и на фоторецепторы (Zhao et al., 2011). В связи с чем, ингибирование mTOR является вполне убедительной терапевтической стратегией для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки человека, вызванных повреждением РПЭ (Zhao et al., 2011).

На мышинной модели со специфическим нокаутом в РПЭ гена *tuberous sclerosis 1 (Tsc1)*, который кодирует вышестоящий супрессор mTORC1, подтверждено участие mTORC1 в дегенерации РПЭ (Go et al., 2020). Используя метаболомный и геномный анализы, исследователи выявили, что гиперактивный mTORC1 приводит к преобразованию метаболического пути в РПЭ за счет увеличения гликолиза (Go et al., 2020). Однако, несмотря на очевидную роль mTORC1 в старении РПЭ и возрастной дегенерации, клинические испытания рапамицина у пациентов с географической атрофией не увенчались успехом (Petrou et al., 2014). Го и соавт. предполагают, что сетчатка и РПЭ имеют разные метаболические пути, а сигнал mTORC1 является фактором выживания фоторецепторных клеток. Соответственно, рапамицин оказался токсичным для клеток сетчатки у пациентов с ВМД. Поскольку mTORC1 находится на вершине сигнальной сети и контролирует несколько направлений клеточных процессов, необходимы дополнительные исследования, направленные на рассеяние сигнала ниже по течению, чтобы избежать полного ингибирования эффектов mTORC1 при возрастных заболеваниях (Go et al., 2020).

В работах по изучению изменений цитоскелета клеток РПЭ под действием TGF- β показана активация *RhoA/Rho-associated protein kinase (ROCK) сигнального каскада* (Lee et al., 2008; Huang et al., 2012; Zhu et al., 2013). Rho-семейство малых ГТФаз – это семейство “малых” клеточных сигнальных белков (около 21 кДа), принадлежащих к суперсемейству Ras-подобных белков. Среди 20 белков млекопитающих наиболее изучены Rac1 и RhoA (Boueux et al., 2007). Показано, что Rac1 белок играет ключевую роль в регуляции полимеризации актина и способствуют формированию ламеллоподий на переднем крае мигрирующих клеток (Bustelo et al., 2007; Huang et al., 2012). Белок RhoA играет важную роль в образовании и стабильности клеточных контактов, он активирует ROCK, относящуюся к типу серин/треониновых протеинкиназ (Bustelo et al., 2007). Известно около 20 субстратов, фосфорилируемых ROCK,

включая белки цитоскелета, легкие цепи миозина, фосфатазу миозина, LIM-киназу, которая через фосфорилирование кофилина играет важную роль в полимеризации актина. ROCK вовлечена в различные виды активности клетки, такие как организация цитоскелета, формирование стресс-волокон и фокальных контактов, деление, миграция, апоптоз (Boueux et al., 2007; Bustelo et al., 2007).

Сравнение эффектов TGF- β 2 и стекловидного тела, основного источника TGF- β 2, выявило разный ответ нетрансформированных клеток РПЭ (Parapuram et al., 2009). Так, только TGF- β 2 стимулировал в клетках РПЭ дифференцировку в миофибробласты, которые, как предполагается, вызывают сокращение эпиретинальных мембран. О дифференцировке в миофибробласты свидетельствовали изменения в цитоскелете клеток, проявляющиеся в формировании стресс-волокон с комплексами фокальной адгезии, и повышение экспрессии специфичных для миофибробластов генов α SMA и CTGF. И наоборот, при обработке стекловидным телом отмечено формирование коротких филаментов, которые концентрировались в ламеллоподиях или филоподиях, и снижение экспрессии мРНК α SMA и CTGF (Parapuram et al., 2009). Кроме того, при обработке стекловидным телом, исследователи отметили более выраженную подвижность клеток РПЭ, что, по мнению авторов, не может быть объяснено присутствием в стекловидном теле одного только TGF- β 2, а указывает на роль других сигнальных молекул. Исследователи предполагают, что витреальный TGF- β 2 играет важную начальную роль в ЭПМ, однако в последующем происходит подавление TGF- β пути (Parapuram et al., 2009). И в этом подавлении может участвовать BMP2 сигнальный путь, активацию которого при обработке клеток РПЭ стекловидным телом наблюдали другие исследователи (Ganti et al., 2007).

Воздействие TGF- β 1 на первичные клетки РПЭ взрослого человека ранних пассажей и клетки линии ARPE-19 приводило не только к увеличению фосфорилирования Smad2/3, но и к активации Rac1 и RhoA, что сопровождалось увеличением мезенхимальных маркеров (Lee et al., 2008; Huang et al., 2012). Воздействие на RhoA/ROCK сигнальный каскад как потенциальную мишень ЭМП клеток РПЭ и новый терапевтический подход в лечении ПВР активно разрабатывается *in vitro* (Zhu et al., 2013). Предобработка специфическими ингибиторами: малой молекулой NSC23766 (ингибитор белка Rac1), гидроксифасудилом (активный метаболит фасудила) или малой молекулой Y-27632 (ингибиторы ROCK) предотвращала фибробластоподобные изменения в цитоскелете клеток РПЭ (Lee et al., 2008; Huang et al., 2012; Zhu et al., 2013). Кроме того, фасудил значительно ингибировал развитие экспериментального ПВР в глазах кроликов, не влияя на жизнеспособность клеток

сетчатки по данным электроретинографического и гистологического анализов (Kita et al., 2008).

Помимо специфических ингибиторов ROCK (фасудила и Y-27632) ингибитором ROCK и casein kinase 1 (СК1) является никотинамид, дериват витамина В3 (Meng et al., 2018). С 2009 года никотинамид активно используют в протоколах направленной дифференцировки iPSCs и ESCs человека в РПЭ (Buchholz et al., 2013; Zhao et al., 2017; Saini et al., 2017), когда Идельсон с соавт. показали увеличение эффективности генерации РПЭ из ESCs человека до 33% через 6 недель после добавления никотинамида и активина А (Idelson et al., 2009). Никотинамид подавляет фосфорилирование легкой цепи миозина, подавляет сокращение актомиозина и приводит к повышению выживаемости клеток (Meng et al., 2018). В последнее время роль никотинамида в возврате клеток РПЭ из недифференцированного при ЭМП в дифференцированное состояние пристально изучается *in vitro* (Hazim et al., 2019; Boles et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Таким образом, различные исследования TGF- β сигнальных путей, участвующих в патологических процессах в РПЭ, выполненных в основном на клеточной линии РПЭ человека ARPE-19, выявили, что ведущая роль в ЭМП клеток РПЭ принадлежит двум изоформам TGF- β 1 (Mitsuhiro et al., 2003; Lee et al., 2008; Li et al., 2011; Dvashi et al., 2015; Kim et al., 2020) и TGF- β 2 (Priglinger et al., 2004; Saika et al., 2005; Chen et al., 2014a), тогда как BMP4 и BMP7 противодействуют их эффектам (Yao et al., 2016, 2019). Хотя TGF- β 1 в стекловидном теле обнаруживается лишь в латентной форме, его активация возможна при патологии, чему может способствовать, например, снижение pH среды при воспалении. Поскольку участие TGF- β 1 в ЭМП клеток РПЭ продемонстрировано в ряде исследований *in vitro*, высвобожденный активный TGF- β 1 из латентной формы в стекловидном теле также может вызывать ЭМП клеток РПЭ при контакте с компонентами стекловидного тела. В связи со сказанным роли витреальных TGF- β (TGF- β 1 и TGF- β 2) в ЭМП клеток РПЭ еще предстоит уточнить.

Факторы роста и цитокины в активации неканонических TGF- β сигнальных путей и развитии ЭМП

Хотя TGF- β , по-видимому, играет ключевую роль в стимуляции клеток РПЭ для формирования эпиретинальных мембран, многие другие факторы так же могут быть вовлечены в патогенез витреоретинальных расстройств и других, связанных с ЭМП ретинохориоидальных заболеваний. Так, в аспиратах стекловидного тела при ПВР помимо повышенного содержания TGF- β , обнаружены и такие факторы роста, как фактор

роста гепатоцитов (HGF) и эпидермальный фактор роста (EGF), и провоспалительный цитокин TNF α (табл. 1).

Воздействие TNF α на клетки ARPE-19 индуцировало образование фиброзных очагов (Takahashi et al., 2010). Через взаимодействие гиалуроновой кислоты с CD44—моозином TNF α опосредовал активацию TGF- β сигнального пути. TNF α способствует экспрессии CD44, основного рецептора трансмембранной адгезии для гиалуроновой кислоты, и фосфорилированию моозина с помощью протеинкиназы С (англ. protein kinase C, PKC), что приводит к перичеллюлярному взаимодействию гиалуроновой кислоты и CD44. Образование комплекса гиалуроновая кислота—CD44—моозин приводит к нарушению межклеточных контактов и повышению подвижности клеток за счет ремоделирования актина. Кроме того, комплекс гиалуроновая кислота—CD44—моозин связывается с TGF β R-II и клатрином в актиновых микродоменах с последующей активацией передачи сигналов TGF- β и индукцией мезенхимального фенотипа в клетках РПЭ (Takahashi et al., 2010). Помимо этого, авторы продемонстрировали, что фиброз, индуцированный инъекцией TNF α в сетчатку мыши, заметно подавлялся у мышей, нокаутированных по CD44. Эти данные указывают на то, что взаимодействие гиалуроновой кислоты с CD44 играет ключевую роль в фиброзных расстройствах, ассоциированных с ЭМП. Как показано на клетках ARPE-19, TNF α активирует АКТ, mTORC1 и mTORC2. Однако только АКТ/mTORC1 сигнальный путь необходим для TNF α -опосредованной миграции клеток РПЭ (Liu et al., 2012) и экспрессии MMP9 в клетках РПЭ *in vitro* (Wang et al., 2012).

Активация ERK и PKC δ сигнальных путей отмечена и при экзогенном добавлении HGF в сочетании с EGF к линейным ARPE-19 и первичным клеткам РПЭ, синергетическое действие которых стимулировало миграцию клеток (Chen et al., 2012c).

МикроРНК (miRNAs) в регуляции TGF- β сигнального пути и ЭМП

В настоящее время появляется все больше исследований, направленных на изучение роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ (Wang et al., 2010; Adijanto et al., 2012; Donato et al., 2018; Shahriari et al., 2020). Так, показано, что при TGF- β 2-индуцированном ЭМП в клетках ARPE-19 по-разному экспрессируются 304 miRNAs. Из этих дифференциально экспрессируемых miRNAs регуляция 185 подавлена, тогда как регуляция 119 повышена как минимум в два раза (Chen et al., 2014b). Отмечено, что в клетках ARPE-19 после обработки TGF- β 2 резко снижается экспрессия miR-let7c и активируется путь

передачи сигнала nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) (Deji et al., 2020). NF- κ B регулирует большое число генов, многие из которых являются критическими для выживания клеток. NF- κ B является ключевым регулятором воспалительных сигнальных каскадов, он участвует в индукции и поддержании ЭМП и в неоваскуляризации сетчатки (Yang et al., 2015b; Moon et al., 2017b; Luo et al., 2018). NF- κ B стимулирует выработку различных факторов роста, включая TGF- β , и провоспалительных цитокинов (например, IL-8, TNF α), молекул адгезии, ангиогенных факторов (например, фактора роста эндотелия сосудов, англ. vascular endothelial growth factor, VEGF), а также ферментов деградации ВКМ (например, MMP9), активность которых связана с миграцией клеток. В то же время NF- κ B активируется в ответ на различные стимулы — воспалительные цитокины, клеточный стресс, а также факторы роста (Yang et al., 2015a). Известно, что NF- κ B способствует стабилизации белка Snail, предотвращая его фосфорилирование внутриклеточной киназой гликогенсинтазы-3 β (англ. glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) и последующую деградацию (Thiery et al., 2009). Потеря активности NF- κ B снижает экспрессию генов, связанных с ЭМП (Moon et al., 2017b).

В ряде исследований показано, что критическую роль в дифференцировке клеток РПЭ играет семейство miR-204/211 (Wang et al., 2010; Adijanto et al., 2012). MiR-204/211 регулируют *MITF*, что способствует поддержанию эпителиального фенотипа в фетальных клетках РПЭ человека (Adijanto et al., 2012). Кроме того, прямыми мишенями miR-204 являются *TGF β R-II* и *SNAI2* (также известный как *SLUG*) (Wang et al., 2010). Помимо miR-204/211 и семейства let7 ряд других miRNAs, такие как miR-29b (Li et al., 2016), miR-93 (Fuchs et al., 2020), miR-124 (Jun, Joo, 2016) и miR-194 (Cui et al., 2019) могут быть молекулярными регуляторами и потенциальными терапевтическими мишенями при развитии ЭМП при ПВР.

Например, ингибирование miR-29b в клетках ARPE-19 напрямую запускает процесс ЭМП, который характеризуется фенотипическими изменениями, активацией α SMA, подавлением E-кадгерина и ZO-1 и повышенной миграцией клеток (Li et al., 2016). Мишенью miR-29b является *AKT2*, подавление которого ингибирует TGF- β 1-индуцированный ЭМП (Li et al., 2016). Сверхэкспрессия miR-194 значительно ингибирует TGF- β 1-индуцированный ЭМП клеток ARPE-19, при этом значительно снижается экспрессия *CDH2* (ген N-кадгерина) и других генов, которые регулируются ZEB1 (Cui et al., 2019). При прогрессировании ЭМП в клетках ARPE-19 снижается уровень экспрессии miR-124, а ингибирование эндогенной miR-124 способствует увеличению мезенхимальных и снижению эпителиальных маркеров

(Jun, Joo, 2016). Сверхэкспрессия miR-124 увеличивает уровни ZO-1 и окклюдина, подавляет уровни фибронектина, α SMA и виментина, а также подавляет TGF- β 1-индуцированное сокращение коллагенового геля клетками РПЭ (Jun, Joo, 2016).

Как показано в исследовании Фукса и соавт., мишенями для miR-302d являются *TGF β R-II*, *SMAD2* и *SMAD3*, три основных гена TGF- β /Smad сигнального каскада, тогда как miR-93 регулирует только *TGF β R-II* (Fuchs et al., 2020). После воздействия TGF- β и трансфекции miR-302d или miR-93 в клетках ARPE-19 выявлено значительное снижение секреции VEGF-A, играющего решающую роль в CNV при ВМД. Однако роль miR-302d в дифференцировке клеток РПЭ остается противоречивой. Так, по мнению Фукса и соавт., обе miRNAs (miR-302d и miR-93) могут возвращать TGF- β -индуцированные мезенхимальные клетки ARPE-19 в эпителиоподобное состояние и, следовательно, способствовать МЭП (Fuchs et al., 2020). Однако в другом исследовании показано, что miR-302d-3p индуцирует дедифференцировку клеток ARPE-19, что проявляется снижением характерных маркеров РПЭ и прерыванием фагоцитоза, а также способствует миграции клеток, их пролиферации и прогрессированию клеточного цикла (Jiang et al., 2018). В этом же исследовании потенциальным вышестоящим фактором транскрипции для miR-302d-3p был идентифицирован c-Jun, а нижестоящей мишенью — p21, ингибитор циклинзависимой киназы, кодируемый геном *CDKN1A*. Данные этой работы свидетельствуют о том, что p21 может способствовать дифференцировке РПЭ, ингибировать его пролиферацию, развитие клеточного цикла и миграцию, тогда как miR-302d-3p подавляет дифференцировку РПЭ посредством прямого нацеливания на p21 (Jiang et al., 2018).

Стратегии воздействия на TGF- β сигнальный путь и ЭМП клеток РПЭ

На сегодняшний день очевидно, что комплекс растворимых факторов, в том числе из сыворотки крови и стекловидного тела, и ВКМ тесно переплетены при развитии ЭМП клеток РПЭ. Результаты работ, выполненных в основном на клеточной линии ARPE-19, свидетельствуют о том, что различные факторы роста и сигнальные молекулы могут запускать ЭМП клеток РПЭ, понижая их уровень дифференцировки и способствуя пролиферации (Yang et al., 2015b; Dvashi et al., 2015; Yao et al., 2016). Рецепторы с высоким сродством к таким факторам роста, как EGF, FGF, IGF, HGF, TGF α и PDGF, которые обнаруживаются в стекловидном теле при пролиферативных витреоретинапатиях (табл. 1), принадлежат к разным подклассам рецепторных тирозинкиназ. Однако все они могут активировать сходные внутриклеточ-

ные сигнальные пути, в том числе MAPK/ERK и PI3K/АКТ/mTOR (Thiery et al., 2009; Gonzalez, Medici, 2014; Liu et al., 2015).

В отличие от факторов, которые запускают ЭМП, очевидно, что TGF- β является его основным регулятором (Dvashi et al., 2015; Yao et al., 2016). Он способствует миграции клеток РПЭ и активирует в них синтез компонентов ВКМ. Участие двух изоформ TGF- β (TGF- β 1 и TGF- β 2) в ЭМП клеток РПЭ продемонстрировано в ряде исследований (Mitsuhiro et al., 2003; Priglinger et al., 2004; Saika et al., 2005; Lee et al., 2008; Li et al., 2011; Chen et al., 2014a; Dvashi et al., 2015; Kim et al., 2020).

Учитывая важную роль ЭМП в патогенезе ПВР, таргетная терапия ЭМП считается потенциальным методом лечения этого заболевания. В настоящее время ведутся исследования по блокированию TGF- β сигнального пути на всех уровнях — от его лигандов и рецепторов до ядерных рецепторов. Эти ингибиторы включают как малые молекулы (англ. small molecule drugs), так и большие молекулы или биопрепараты (англ. large molecules or biologics).

Большинство современных ингибиторов передачи сигналов TGF- β , которые нацелены на нейтрализацию всех его изоформ или на прямое ингибирование киназной активности его рецепторов, более подробно рассмотрены в обзорах (Yang et al., 2015b; Györfi et al., 2018; Huynh et al., 2019). Среди них, например, LY-364947, селективный ингибитор TGF β R-I. Так, LY-364947 предотвращал ЭМП клеток РПЭ быка *in vitro*, а также уменьшал площадь фиброза в месте травмы и предотвращал тракционную отслойку сетчатки на модели ПВР кролика *in vivo* (Nassar et al., 2014). Другой препарат, глюкозамин (англ. glucosamine), снижающий уровень экспрессии рецептора TGF- β и ингибирующий связывание TGF- β с поверхностью клеток, ослаблял ЭМП в клетках ARPE-19 и уменьшал морфологические изменения на модели ПВР (отслойки сетчатки) мыши (Liang et al., 2011).

Однако стратегии по напрямую нацеливанию на TGF- β и его рецепторы ингибируют все функции передачи сигналов семейства TGF- β , что может быть связано с неприемлемыми побочными эффектами (Györfi et al., 2018). Поэтому было разработано множество альтернативных стратегий для воздействия на TGF- β на других уровнях, в том числе на уровне внутриклеточных сигнальных каскадов, задействованных в профибротических эффектах, а также на уровне транскрипционных факторов, ядерных рецепторов и miRNAs. Например, деацетилирование Smad4 при использовании биологически активной добавки ресвератрола (англ. resveratrol) приводило к ингибированию ЭМП (подавление пролиферации и миграции клеток и синтеза фибронектина) в фетальных

клетках РПЭ, а также к подавлению прогрессирующего ПВР в модели кролика (Ishikawa et al., 2015).

Специфическое ингибирование транскрипционного фактора Snail, участника Smad-зависимой передачи сигналов TGF- β , репрессирующего экспрессию адгезивных молекул, и, таким образом, регулирующего переход от эпителия к мезенхиме, может обеспечить новый подход к лечению и предотвращению ПВР (Li et al., 2011).

В дополнение к сказанному, в качестве терапевтических подходов в лечении ПВР предлагают подавлять в клетках РПЭ следующие мишени Smad-независимой передачи сигналов TGF- β : p38 MAPK (Saika et al., 2005; Dvashi et al., 2015), ERK1/2 (Chen et al., 2014a), mTOR (Zhao et al., 2011; Kim et al., 2020) и RhoA/ROCK (Lee et al., 2008; Kita et al., 2008; Zhu et al., 2013).

Важная роль в дифференцировке клеток РПЭ показана в ряде исследований с использованием таких ингибиторов ROCK, как Y-27632 (Zhu et al., 2013), фасудил (Lee et al., 2008; Kita et al., 2008) и никотинамид (Hazim et al., 2019; Boles et al., 2020). Для примера, обработка никотинамидом первичных клеток РПЭ человека предотвращала ЭМП и сократительное поведение, стимулированное комбинированным воздействием TGF- β 1 и TNF α (Boles et al., 2020).

В дополнение к этому, ингибирование NF- κ B представляет собой многообещающую терапевтическую стратегию для предотвращения или контроля глазных фиброзных заболеваний, возникающих из-за ЭМП (Moon et al., 2017b). Так, обработка клеток ARPE-19, стимулированных TGF- β 1, препаратом бортезомиб (англ. bortezomib), применяемым в противоопухолевой терапии, подавляла сигнальный каскад NF- κ B и повышала экспрессию ингибитора NF- κ B — I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha). Бортезомиб подавлял регуляцию мезенхимальных маркеров (N-кадгерин, виментин, α SMA и β -катенин) и повышал активность эпителиальных маркеров (ZO-1 и окклюдин), что свидетельствует об ингибировании ЭМП в клетках РПЭ и предотвращении развития ПВР путем подавления пути TGF- β (Moon et al., 2017b).

Исследование влияния агониста ядерного рецептора peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) троглитазона (англ. troglitazone), препарата из группы пероральных гипогликемических препаратов, на TGF- β 2-опосредованные ответы в клетках ARPE-19 показало, что троглитазон эффективно ингибировал продукцию компонентов ВКМ (коллагена I типа и фибронектина) как на уровне мРНК, так и на уровне белка, и подавлял миграцию клеток РПЭ (Cheng et al., 2008). Кроме того, троглитазон подавлял индуцированное TGF- β 2 фосфорилирование Smad2 и

Smad3 и их последующую ядерную транслокацию, что, возможно, является молекулярным механизмом, объясняющим подавление ЭМП в клетках РПЭ. В дополнение к этому, троглитазон не влиял на индуцированное TGF- β 2 фосфорилирование p38 MAPK (Cheng et al., 2008).

В дополнение к сказанному, в настоящее время ряд miRNAs (например, miR-204/211, семейство let7, miR-29b, miR-93, miR-124, miR-194 и miR-302d) и длинные некодирующие (lnc) RNA (lncRNA) рассматриваются в качестве важных модуляторов передачи сигналов TGF- β и ЭМП клеток РПЭ (Wang et al., 2010; Adijanto et al., 2012; Jun, Joo, 2016; Li et al., 2016; Cui et al., 2019; Fuchs et al., 2020; Salmaninejad et al., 2022). Хотя lncRNA менее изучены, они могут быть не менее важными, поскольку могут выполнять свои регуляторные роли через спонжирование miRNA (Salmaninejad et al., 2022). Поскольку miRNAs могут подавлять экспрессию практически всех генов и их транскриптов мРНК, они имеют преимущества над препаратами на основе малых молекул, воздействующих только на определенные классы белков, и препаратов на основе белков, включая высокоспецифичные моноклональные антитела, мишени которых в основном ограничены рецепторами на поверхности клетки или циркулирующими белками (Lam et al., 2015). Возможность локальной доставки miRNAs непосредственно в глаз может быть полезным в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний.

Помимо таргетной терапии при ПВР, намечены маркерные белки, экспрессия которых изменяется при развитии ПВР и ВМД. В частности, экспрессия компонента Janus kinase (JAK)/Signal transducer and activator of transcription (STAT) сигнального пути, транскрипционного фактора STAT3, и ключевого активатора различных цитокинов и факторов роста, увеличивается в РПЭ при образовании CNV (Fasler-Kan et al., 2005). При влажной форме ВМД отмечается снижение или даже отсутствие белка BMP4 в хориваскулярных мембранах (Zhu et al., 2009a), что связано с ингибирующим влиянием TNF α (Xu et al., 2011).

Кроме сказанного, идентификация и анализ паттерна экспрессии miRNAs во внутриглазной жидкости или стекловидном теле пациентов с различной патологией (диабетической ретинопатией, глаукомой) в настоящее время является предметом многих офтальмологических исследований (Jayaram et al., 2017; Martinez, Replow, 2019; Chen et al., 2019). Помимо этого, дальнейшие исследования по дифференциально экспрессируемым miRNAs в сетчатке и РПЭ необходимо продолжить, поскольку это поможет как в идентификации биомаркеров пролиферативных и дегенеративных заболеваний сетчатки, так и в установлении по-

тенциальных мишеней для терапии препаратами на основе miRNAs.

FGF/FGFR СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

Семейство FGF у человека состоит из 22 членов, которые на основе их различных функций и конечных биологических эффектов, за исключением четырех несекретируемых интракринных факторов (FGF11-14), могут быть подразделены на митогенные/паракринные (FGF1/2, FGF4/5/6, FGF3/7/10/22, FGF8/17/18 и FGF9/16/20) и метаболические/эндокринные FGF (FGF19 (мышинный FGF15)/21/23), явно регулирующие клеточную пролиферацию и субстратный/энергетический метаболизм соответственно (Ornitz, Itoh, 2015; Li, 2019; Ferguson et al., 2021; Loda et al., 2022). Члены семейства FGF играют важную роль на самых ранних стадиях эмбрионального развития и во время органогенеза, они поддерживают клетки-предшественники и опосредуют их рост, дифференцировку и выживание. Во взрослом организме члены семейства FGF поддерживают гомеостаз, участвуют в восстановлении тканей (физиологическая регенерация) и синтезируются в ответ на повреждение (репаративная регенерация) (Ornitz, Itoh, 2015).

У млекопитающих секретируемые FGF (FGF1-10, FGF15-23) опосредуют свои биологические эффекты через связывание с четырьмя специфическими, высокоаффинными рецепторами клеточной поверхности (FGFR1, 2, 3, 4), выраженными в виде ряда вариантов сплайсинга (Ornitz, Itoh, 2015; Li, 2019). FGFRs принадлежат к семейству тирозинкиназных рецепторов и представляют собой трансмембранные белки с тремя IgG-подобными доменами в их эктодомене и двумя тирозинкиназными доменами во внутриклеточной части (Nguyen, Mège, 2016; Ferguson et al., 2021). В зависимости от сплайсинга трех экзонов третьего Ig-подобного домена полученные изоформы рецепторов (IgIIIb и IgIIIc) имеют отчетливые различия в специфичности связывания лиганда. Например, FGFR2 имеет эпителиальную FGFR2-IIIb и мезенхимальную FGFR2-IIIc изоформы (Warzecha et al., 2009; Ferguson et al., 2021).

Связывание канонических FGF лигандов на клеточной поверхности с IgG-подобными эктодоменами родственных им трансмембранных FGFR в комплексе с мотивами гепарансульфат протеогликанов (англ. heparan sulfate proteoglycan, HSPG)/гепарина важно и необходимо для образование двух тройных комплексов FGF-FGFR-HSPG/гепарин и последующей их димеризации и интернализации и активации внутриклеточных тирозинкиназных доменом FGFRs (Li, 2019; Xie et al., 2020). Активация последних запускает многочисленные внутриклеточные сигнальные каскады, управляющие ключевыми клеточными событиями,

включая пролиферацию, миграцию и выживание клеток (Nguyen, Mège, 2016). На сегодняшний день известно о четырех внутриклеточных сигнальных путях, передающих сигналы секретируемых FGFs: MAPK/ERK, PI3K/АКТ, фосфолипазы C γ (англ. phospholipase C γ , PLC γ)/PKC и JAK/STAT. Однако специфика клеточного ответа при связывании FGFs с FGFRs неясна (Ornitz, Itoh, 2015). Ключевым компонентом негативной регуляции FGF-зависимого PI3K/АКТ-сигнального пути является GSK3 β (Katoh, Katoh, 2006; Ding et al., 2010).

Среди митогенных FGFs, FGF2, ранее известный как основной FGF (англ. basic FGF, bFGF), негликозилированный полипептид, состоящий из 146 аминокислот, с молекулярной массой 18 кДа (Arnaud et al., 1999), связывается со всеми четырьмя FGFRs, за исключением FGFR2-IIIb (Ferguson et al., 2021). FGF2 действует локально при возникновении повреждения, оказывая митогенный эффект на клетки тканей нейроэктодермального и мезодермального происхождения (Schweigerer, 1988). На поверхности клетки FGF2 связывается с HSPG, а именно с мембранными молекулами (например, синдеканы и глипиканы) или с тесно связанными с мембранной молекулами (например, перлекан), которые усиливают или ингибируют активность данного фактора (Nugent, Iozzo, 2000). Также имеется ряд других связывающихся с FGF2 молекул, включая интегрин $\alpha\beta 3$ (рецептор для витронектина), растворимый FGFR1, тромбоспондин, фибриноген, $\alpha 2$ -макроглобулин, тромбоцитарный фактор роста (англ. platelet-derived growth factor, PDGF) и другие, а также неканонические партнеры по сигнализации FGFR, включая белки ВКМ, молекулы клеточной адгезии (CAMs), корецепторы и другие тирозинкиназные рецепторы, что тонко настраивает активность FGF2 в зависимости от расположения и количества этих партнеров (Ferguson et al., 2021).

FGF2 участвует в развитии глаза, способствуя специализации нейроэпителлия в сетчатку (Bharti et al., 2006). Добавление FGF2 к культивируемым глазным пузырям куриных эмбрионов способствует нейрональной дифференцировке презумптивного РПЭ и образованию двойной сетчатки (Pittack et al., 1997).

В заднем отделе глаза FGF2 выявляется в клетках макроглии (астроциты, клетки Мюллера) и ганглиозных клетках сетчатки, а также в ядрах и цитоплазме клеток РПЭ млекопитающих (Walsh et al., 2001; Yafai et al., 2013) и низших позвоночных (Markitantova et al., 2014). Кроме того, на срезах сетчатки приматов FGF2 выявлен в межфоторецепторном матриксе, что свидетельствует о том, что он секретируется различными типами клеток сетчатки и сосудистой оболочки в межфоторецепторный матрикс и может участвовать в регуляции функций наружных сегментов фоторе-

цепторов и РПЭ (Hageman et al., 1991). Участие FGF2 в предотвращении дегенерации фоторецепторов подтверждает исследование, когда интравитреальные инъекции наночастиц, импрегнированных FGF2, ингибировали апоптоз клеток сетчатки крыс RCS с наследственной дегенерацией сетчатки (Sakai et al., 2007).

FGF2 принимает участие в иницировании самых ранних ответов сетчатки на ее отслойку (Geller et al., 2001; Yasumuro et al., 2017), у взрослых хвостатых амфибий он является ключевым регулятором дедифференцировки РПЭ с высокой способностью к регенерации сетчатки (Markitantova et al., 2014). После ретинэктомии в клетках РПЭ взрослого тритона отмечается временное усиление активности ERK, затем клетки РПЭ теряют свои эпителиальные характеристики, пролиферируют, и, не проявляя классические признаки ЭМП, дифференцируются в нейральном направлении, регенерируя сетчатку (Yasumuro et al., 2017). При экспериментальной отслойке сетчатки у кошек, в клетках Мюллера и РПЭ происходит ряд схожих последовательных событий: FGFR1, высокоаффинный рецептор FGF2, фосфорилируется с последующей дефосфорилизацией, фосфорилируется ERK и увеличивается экспрессия фактора транскрипции AP-1 (англ. activator protein) (Geller et al., 2001), который индуцирует ЭМП клеток путем модулирования экспрессии *Zeb1/2* и TGF- β (Bakiri et al., 2015). Следует отметить, что развитие ЭМП у тритонов возможно при нокауте *Pax6*. При подавлении экспрессии *Pax6* клетки РПЭ трансгенных тритонов дифференцируются в фибробластоподобные клетки, экспрессирующие α SMA, виментин и N-кадгерин, и при этом регенерации сетчатки не происходит (Casco-Robles et al., 2016).

Известно, что N-кадгерин может связываться с первыми двумя внеклеточными IgG-подобными доменами FGFR1 (Suyama et al., 2002). Вследствие этого взаимодействия FGFR1 не интернализуется FGF2 эффективно, вызывая устойчивую экспрессию FGFR1 на клеточной поверхности, что приводит к стойкой активации MAPK/ERK, экспрессии MMP9, развитию ЭМП, включая повышенную регуляцию Snail и Slug (SNAI2), а также снижение экспрессии эпителиальных и повышение экспрессии мезенхимальных генов, инвазии, пролиферации клеток и проявлении ими свойств стволовых/прогениторных клеток (Suyama et al., 2002; Qian et al., 2014). При этом усиливается активность FGFR2-IIIc (Qian et al., 2014). Устойчивая экспрессия FGFR1 приводит к дифференциальной передаче сигналов с помощью ERK и АКТ (Suyama et al., 2002; Qian et al., 2014). Возможно, подобный механизм активации FGFR1 существует при ЭМП клеток РПЭ, что требует дополнительных исследований.

Как показали предыдущие исследования, FGF2 обнаруживается в высокой концентрации в неоваскулярной ткани при ВМД и активируется в индуцированных лазером CNV мембранах (Amin et al., 1994). Кроме того, в клетках РПЭ в CNV мембранах обнаружена экспрессия FGFR-1 и FGFR-2 (Rosenthal et al., 2005).

In vitro в клетках РПЭ человека FGF2 выявляется как на транскрипционном, так и на белковом уровнях (Sternfeld et al., 1989; Schwegler et al., 1997). Известно, что транскрипция генов (фактора и его рецепторов) зависит от плотности клеток и адгезии к твердому субстрату. Так, уровень транскрипции FGF2 является самым высоким в культурах с низкой плотностью и, наоборот, мРНК и белок FGF2 снижается при увеличении плотности клеток и в слитом монослое. Предполагается, что сборка межклеточных контактов может переключать клетки РПЭ с синтеза и секреции FGF2 на экспрессию его рецепторов (Bost, Hjelmeland, 1993).

Добавление FGF2 к клеткам ARPE-19 выявило активацию обоих рецепторов FGFR-1 и FGFR-2. При этом стимуляция FGFR-1 приводила к независимому от Ca^{2+} -канала изменению экспрессии генов (например, *FOS*), тогда как стимуляция FGFR-2 – к зависимой от Ca^{2+} канала стимуляции секреции VEGF (Rosenthal et al., 2005). Следует отметить, что *c-Fos* является членом семейства индуцируемых факторов транскрипции AP-1, белок *c-Fos* практически не выявляется в покоящихся клетках, его экспрессия быстро, но лишь временно индуцируется как часть ядерной реакции на множество стимулов, в том числе факторами роста (Caputto et al., 2014).

Считается, что FGF2 является антагонистом TGF- β (Wiedemann, 1992). В исследовании Ханта и соавт. обработка клеток РПЭ человека ранних пассажей стекловидным телом, источника TGF- β , приводила к морфологическим изменениям сходным с ЭМП, что сопровождалось снижением экспрессии мРНК и белка FGF2. Добавление FGF2 вместе со стекловидным телом предотвращало некоторые эффекты, опосредованные стекловидным телом (Hunt et al., 1998). Однако, как было показано позже, FGF2 действует против TGF- β в субконфлюэнтных культурах, но аддитивно с EGF и TGF- β 1 в конфлюэнтных культурах путем активации передачи сигналов Smad/ZEB1/2 (Chen et al., 2012a). Так, обработка FGF2 первичной культуры фетального РПЭ с низкой или высокой (субконфлюэнтность) плотностью посева улучшало морфологию культур и предотвращало потерю клетками эпителиального фенотипа (Radeke et al., 2015). Сохранение морфологии клеток при воздействии FGF2 было схожим с таковым при воздействии ингибитора TGF β R-I (A-83-01) или ингибитора Rho/ROCK1/2 (Thiazo-

vivin). Напротив, в контрольных культурах и культурах, обработанных антагонистом передачи сигналов WNT (XAV939), который повышает уровень аксина (англ. Axin), ключевого белка, участвующего в деградации β -катенина, или ингибитором BMPR-I (LDN-193189), отмечалась потеря клетками эпителиального фенотипа (Radeke et al., 2015).

Более ранние работы по изучению влияния FGF2 на пролиферацию неиммортизированных клеток РПЭ млекопитающих, главным образом, были связаны с выявлением оптимальной дозы FGF2 и/или процентного содержания эмбриональной телячьей сыворотки в культуральной среде, влияющих на повышение пролиферативной активности клеток. Из этих работ видно, что митотический эффект проявлялся в среднем спустя 3–4 сут после добавления FGF2 в среду культивирования (Esser et al., 1992; Khaliq et al., 1996; Schwegler et al., 1997). При изучении механизмов, участвующих в запуске пролиферации, показано, что FGF2 запускает в клетках РПЭ взрослого человека многоступенчатый механизм дедифференцировки (Kuznetsova et al., 2019a, 2019b), процесса, который у низших позвоночных является одним из основных для осуществления регенерации (Chiba, Mitashov, 2007). Так, через 24–48 ч после добавления FGF2 к клеткам РПЭ, диссоциированным трипсином/ЭДТА, отмечено снижение пролиферации и понижение дифференцировочного статуса клеток (судя по уменьшению площади клеток, снижению транскрипции *MITF*, *KRT18* и *BMP4* при повышении транскрипции *NES*), что было связано с подавлением β -катенина и Notch сигнального пути (снижением экспрессии генов *JAG1*, *NOTCH1* и *HES1*), тогда как через 72–120 ч после диссоциации и воздействия FGF2 (на преконфлюэнтные клетки) приводило к увеличению пролиферации этих малодифференцированных клеток (судя по увеличению транскрипции *OCT4* и *NANOG* при нарастающем уменьшении площади клеток), что было обусловлено активацией Wnt/ β -катенин (снижение транскрипции *CTNNB1* (ген β -катенина), снижение транскрипции *GSK3 β* с одновременным увеличением транскрипции *CCND1* (ген циклина D1)) и Notch сигнальных путей (увеличение экспрессии *JAG1*) (Kuznetsova et al., 2019a, 2019b).

Схожие проявления со стороны Wnt/ β -катенин сигнального пути были описаны в другом исследовании после воздействия IGF на клетки РПЭ (Steindl-Kuscher et al., 2009). Так, через 48 ч после добавления IGF к клеткам ARPE-19 происходило снижение транскрипции и трансляции β -катенина и *GSK3 β* с одновременным увеличением *CCND1* и пролиферации клеток, что, по мнению авторов, связано с транслокацией β -катенина в ядра клеток и говорит об активации Wnt сигналинга (Steindl-Kuscher et al., 2009).

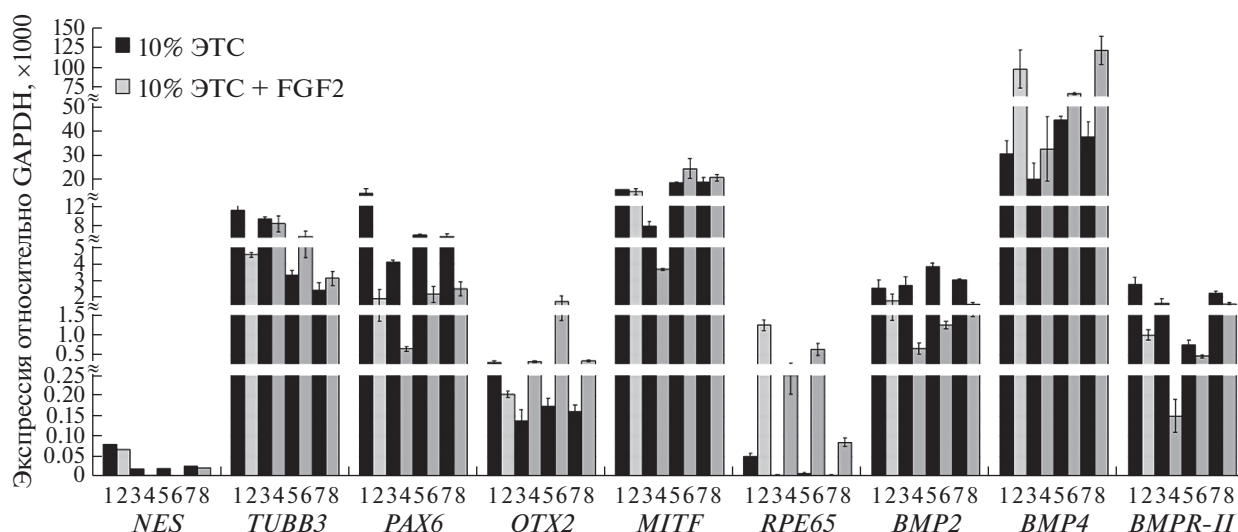


Рис. 2. кПЦР. Экспрессия мРНК *NES*, *TUBB3*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *RPE65*, *BMP2*, *BMP4* и *BMPR-II* в конфлюэнтных монослойных (перед пассированием) первичных культур (столбцы 1, 2), 1-ого (3, 4), 2-ого (5, 6) и 3-его (7, 8) пассажей клеток неиммortalизованной линии РПЭ, культивированных в ростовой среде с 10% ЭТС без FGF2 (черные столбики) и в присутствии 20 нг/мл FGF2 (серые столбики), относительно экспрессии GAPDH, ×1000. Вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

Однако использование антител к транскрипционно активной форме β -катенина (PY-489- β -катенин) показало значительное снижение ядерного β -катенина в клетках РПЭ цыплят после повреждения сетчатки (ретиноктомии) и добавления к ним FGF2 (Zhu et al., 2014). При этом потеря ядерного β -катенина поддерживалась до тех пор, пока присутствовал FGF2. Присутствующие β -катенин-позитивные клетки представляли собой BrdU⁻/p27⁺, что говорит о том, что ядерный β -катенин препятствует продвижению клеток по G1-фазе и вход в S-фазу. Хотя при этом РПЭ подвергался дедифференцировке и пролиферации. Полученные данные, по мнению авторов, свидетельствуют о том, что подавление β -катенина является необходимым условием регенерации сетчатки цыпленка, которая связана с активацией стволовых клеток или клеток-предшественников (Zhu et al., 2014). Данные Чжу и соавт. согласуются с результатами исследования Фуджимура и соавт., когда блокада Wnt/ β -катенин сигнального пути у генетически модифицированных мышей приводила к трансдифференцировке клеток РПЭ в клетки нейральной сетчатки, что подтверждалось снижением РПЭ-специфичных маркеров (в частности, *Mitf* и *Otx2*) и эктопической экспрессией маркеров, специфичных для нейральной сетчатки (*Chx10* и *Rx*) (Fujimura et al., 2009).

Напротив, добавлении FGF2 к слитому монослою (конфлюэнтным клеткам) РПЭ человека приводило к увеличению уровня экспрессии мРНК РПЭ-специфичных маркеров *RPE65*, *OTX2* и *BMP4*, и к снижению уровня экспрессии мРНК нейронального маркера *PAX6* по сравнению с

клетками РПЭ, культивируемыми без FGF2, что свидетельствует об участии FGF2 в редифференцировке клеток РПЭ после их пролиферации (неопубликованные данные) (рис. 2).

В работах Чен и соавт., добавление FGF2 вместе с EGF к постконфлюэнтным клеткам ARPE-19 (на 7-ой день после слияния) не активировало в последних Wnt сигнальный путь, тогда как добавление этих факторов к клеткам, предварительно обработанным хелатирующим агентом (EGTA), нарушало контактное ингибирование и запускало пролиферацию путем активации канонического пути передачи сигналов Wnt (судя по активности промотора T cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF), значительного увеличения уровней ядерного β -катенина и белка LEF1), но не ингибированием передачи сигналов Hippo, и запускало ЭМП за счет активации передачи сигналов Smad/ZEB (судя по увеличению ядерного окрашивания на p-Smad2/3, ZEB1 и ZEB2). О развитии ЭМП свидетельствовала потеря нормального фенотипа РПЭ (изменение цитолокализации RPE65, N-кадгерина, ZO-1 и Na,K-ATФазы) и приобретение мезенхимального фенотипа (повышенная экспрессия виментина, S100A4 и α SMA). Напротив, добавление TGF- β 1 к постконфлюэнтным клеткам ARPE-19, предварительно обработанным EGTA, подавляло пролиферацию и передачу сигналов Wnt (Chen et al., 2012a, 2012b).

Использование различных siRNAs и их комбинаций для нарушения компонентов межклеточных соединений, включая p120-катенин, N-кадгерин, α -катенин, β -катенин или ZO-1, в постконфлюэнтных контактно-ингибированных клетках ARPE-19,

показало, что только нокдаун p120-катенина разблокировал митотический блок без нарушения их нормального фенотипа; нокдаун p120-катенина активировал p120/Kaiso и RhoA/ROCK сигнальные пути, но не влиял на передачу сигналов Wnt/ β -катенина и Smad/ZEB, что предотвращало развитие ЭМП (Chen et al., 2012b). Следует отметить, что только в постконфлюэнтных контактно-ингибированных клетках РПЭ нокдаун p120-катенина активировал пролиферацию, тогда как в диссоциированных трипсином/ЭДТА клетках ARPE-19 он ее снижал (Chen et al., 2012b).

Дальнейшие исследования *in vivo* по воздействию p120-катенин siRNA на включение и выключение пролиферации клеток РПЭ с контактным ингибированием могут помочь в разработке нового метода лечения заболеваний, характеризующихся дисфункцией или дегенерацией РПЭ вследствие старения и повреждения, при которых пролиферация отсутствует или ее стимуляция может привести к ЭМП (Chen et al., 2012b).

В совокупности данные свидетельствуют о том, что в клетках РПЭ, поддерживающих межклеточный контакт, FGF2 или TGF- β не инициируют пролиферацию или ЭМП. При разрушении адгезионных контактов в зависимости от клеточной плотности FGF2 может вызывать дедифференцировку и/или ЭМП и пролиферацию. Так, в диссоциированных трипсином/ЭДТА клетках РПЭ FGF2 индуцирует дедифференцировку, приводя к активации стволовых клеток/клеток-предшественников при подавлении β -катенина, тогда как в прекофлюэнтных клетках РПЭ FGF2 инициирует их пролиферацию и ЭМП, что связано с активацией канонической передачи сигналов Wnt. TGF- β , в свою очередь, играет важную роль после запуска ЭМП – в индукции перехода к фенотипу миофибробластов (фенотипу, связанному с развитием фиброзных осложнений) – при ингибировании пролиферации.

WNT СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

У человека семейство Wnt состоит из 19 секретрируемых гидрофобных гликопротеинов, которые путем предоставления пространственной информации в форме градиента концентрации регулируют различные клеточные процессы, включая определение клеточной судьбы, подвижность, полярность, формирование первичной оси и органогенез, синаптическую пластичность и обновление стволовых клеток (Komiya, Habas, 2008; Nusse, Clevers, 2017).

Внеклеточный Wnt лиганд стимулирует несколько внутриклеточных каскадов передачи сигнала, включая канонический или Wnt/ β -катенин зависимый путь и неканонический или β -катенин-независимый путь, который можно разде-

лить на путь планарной клеточной полярности (англ. planar cell polarity, PCP) и Wnt/ Ca^{2+} путь (Komiya, Habas, 2008). Wnt белки могут передавать сигналы через один канонический или неканонический путь или оба пути. Принято считать, что белки класса Wnt1 (Wnt1, 3, 3a и 8) преимущественно передают сигнал через канонический сигнальный путь, тогда как класс Wnt5a (Wnt4, 5a и 11) в основном активируют неканонические пути (Lad et al., 2009). Кроме того, принято считать, что каноническая ветвь сигнального пути Wnt задействована в контроле пролиферации и дифференцировки клеток, тогда как неканонические сигнальные пути Wnt, такие как PCP и Wnt/ Ca^{2+} сигнальный путь, влияют на организацию цитоскелета и клеточную подвижность клеток РПЭ.

Канонический Wnt/ β катенин сигнальный путь

Канонический Wnt/ β катенин сигнальный путь является эволюционно консервативным, он играет центральную роль во время различных стадий развития сетчатки и в гомеостазе во взрослой сетчатки (Lad et al., 2009).

Канонический Wnt лиганд на клеточной поверхности связывается с рецепторным комплексом, состоящим из рецептора Frizzled (Fzd)-1 или -4 (кодируются генами *FZD1* и *FZD4* соответственно) и ко-рецептором low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)5 или LRP6 (de Jaime-Soguero et al., 2018). В этом комплексе трансмембранная часть Fzd-рецептора взаимодействует с цитоплазматическим белком Dishevelled (Dvl), тогда как внутриклеточный домен LRP5/6 – с белком аксином, что приводит к разборке комплекса деструкции APC-аксин-CK1 α и ингибированию внутриклеточной серинтреониновой киназы GSK3 β . В результате этого ингибируется фосфорилирование β -катенина, что в свою очередь приводит к его накоплению в цитозоле (Xu, Kimelman, 2007). Далее накопленный β -катенин транслоцируется в ядро, где образует множественные белковые комплексы с ингибиторами или ко-активаторами транскрипции Wnt пути и вступает во взаимодействие с ДНК-связывающими белками семейства TCF/LEF (Xu, Kimelman, 2007; de Jaime-Soguero et al., 2018). Вместе они включают транскрипцию “канонических” (β -катенин-зависимых) генов Wnt ответа: *C-MYC*, *CCND1*, *AXIN-2*, *VIMENTIN*, *SNAIL*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*. Таким образом, β -катенин инициирует процесс ЭМП (Evans et al., 2010).

В эпителиальных клетках β -катенин локализуется в примембранной области, где входит в комплекс E-кадгерин-p120-катенин- β -катенин- α -катенин, образующий адгезионные контакты (Katoh, Katoh, 2006). Связь β -катенина с E-кадгерином свидетельствует о стабильной межклеточной адгезии.

GSK3 β является ключевым компонентом регуляции канонического Wnt сигнального пути (Katoh, Katoh, 2006; Ding et al., 2010). Подавление экспрессии GSK3 β и активирование PI3K/АКТ и канонического Wnt сигнальных путей показано на экспериментальной модели травматической ПВР, вызванной у кроликов с помощью интравитреальных инъекций клеток ARPE-19 (Zhang et al., 2018).

В отсутствии Wnt сигнализации GSK3 β в комплексе с белками APC—аксин—СК1 α связывает и фосфорилирует цитоплазматический β -катенин, что приводит впоследствии к его утилизации при помощи убиквитин-протеасом (Staal, 2016; Nusse, Clevers, 2017). Благодаря этому механизму в отсутствие Wnt стимуляции цитоплазматическая концентрация β -катенина поддерживается на низком уровне (Staal, 2016). Интересным фактом является то, что пул β -катенина адгезионных соединений очень стабилен, тогда как период полураспада сигнального пула β -катенина составляет порядка нескольких минут (Nusse, Clevers, 2017).

При разрушении адгезионных контактов могут активироваться два сигнальных пути: через β -катенин и p120-катенин. Последний может запускать путь p120/Kaiso, в котором транслоцированный в ядро p120-катенин ослабляет репрессорную активность Kaiso (кодируется геном *ZBTB33*), члена семейства транскрипционных факторов BTB (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac)/POZ (poxvirus and zinc finger). Известно, что p120-катенин регулирует кадгерин-опосредованные адгезионные контакты, транспортирует кадгеринины на мембрану и стабилизирует их на мембране, регулируя динамическую регуляцию актинового цитоскелета, взаимодействует и стабилизирует микротрубочки, а также ингибирует RhoA и другие Rho ГТФазы, тогда как активация передачи сигналов RhoA/ROCK коррелирует с дестабилизацией микротрубочек, ядерной транслокацией p120 и мечением BrdU (Chen et al., 2012b).

Неконтролируемая передача сигналов Wnt может вызывать заболевания сетчатки, такие как семейная экссудативная витреоретинопатия, пигментный ретинит и болезнь Норри (Lad et al., 2009). Например, причиной семейной экссудативной витреоретинопатии, характеризующейся различными офтальмологическими проявлениями, в том числе развитием рубцов и как следствием отслойкой сетчатки и слепотой, могут быть мутации в генах *FZD4* и *LRP5* (Xu et al., 2004; Lad et al., 2009). Причиной болезни Норри, при которой наблюдаются такие офтальмологические расстройства, как ретролентальная фиброваскулярная мембрана, тракция и отслоение сетчатки, является мутация в гене *NDP*. Ген *NDP* кодирует небольшой секреторный белок норрин (англ.

Norrin) (15 кДа), который экспрессируется в сетчатке, головном мозге и обонятельных луковицах и предположительно участвует в нейрогенезе и межклеточном взаимодействии (Rajendran et al., 2021). Norrin взаимодействует с Fzd4, LRP5 и тетраспанином 12 (англ. tetraspanin 12) и может активировать Wnt путь (Xu et al., 2004; Nusse, Clevers, 2017; Rajendran et al., 2021).

Поскольку канонический Wnt путь активируется в глиальных клетках во время повреждения фоторецепторов, возникло предположение об его участии в дегенерации сетчатки (Hackam, 2005). В частности, предполагается, что Wnt сигнальный путь играет роль в поражении сетчатки при ВМД (Tuo et al., 2015). В срезах сетчатки пациентов с ВМД обнаружены более высокие уровни фосфорилирования белка LRP6 и транскриптов генов, нацеленных на Wnt путь, а также более высокий уровень белка β -катенина в макуле ВМД по сравнению с контрольной группой. В сетчатке мышей с моделью ВМД-подобной дегенерации сетчатки также было выше фосфорилированного LRP6 и нефосфорилированного β -катенина, чем у мышей дикого типа. Интравитреальное введение антител против LRP6 замедляло прогрессирование поражений сетчатки у мышей, что может быть полезным для дезактивации канонического пути Wnt у людей (Tuo et al., 2015).

В то же время, в ряде работ, выполненных на взрослых животных, показано, что активация сигнального каскада Wnt путем экзогенного добавления Wnt белков стимулирует заживление различных травм, включая повреждения сетчатки (Whyte et al., 2012). Так, после повреждения или дегенерации сетчатки у мышей активация сигнального пути Wnt способствовала пролиферации клеток Мюллера и регенерации нервной ткани (Osakada et al., 2007). Воздействие Wnt3a на сетчатку с поврежденными фоторецепторами в 20 раз увеличивало пролиферацию дедифференцированных клеток Мюллера (Osakada et al., 2007).

В клетках РПЭ постнатального организма Wnt/ β -катенин сигнальный каскад участвует в регуляции экспрессии генов, задействованных в предохранении от окислительного стресса (Burke, 2009; Fragoso et al., 2012). Так, защитная роль Wnt3a-лиганда была продемонстрирована на клеточной линии ARPE-19. Клетки обрабатывали Wnt3a в присутствии и без цитотоксических агентов, таких как перекись водорода и паракват. В результате показана повышенная выживаемость клеток РПЭ, которая опосредовалась еще и активацией STAT3 (Fragoso et al., 2012).

In vitro каноническая передача сигналов Wnt определяет фенотипическую пластичность клеток РПЭ. Как недавно было показано, передача сигналов Wnt регулируется аннексином A8

(ANXA8) (Lueck et al., 2020). Аннексины (англ. Annexins, ANXA1–ANXA11, ANXA13) принадлежат к надсемейству кальций-зависимых белков, связывающих фосфолипиды. Они участвуют в организации и структуре фосфолипидной мембраны и белков цитоскелета и играют важную роль в жизненном цикле клеток, экзоцитозе и апоптозе. В частности, ANXA8 локализуется в мембранных участках, богатых фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом, где накапливается F-актин. ANXA8 влияет на пролиферацию и миграцию клеток, а также может играть роль в клеточной дифференцировке (Pimiento et al., 2015). Обработка фенретинидом подавляла экспрессию гена *ANXA8* и РПЭ-специфических генов (*OTX2* и *MITF*), а также на начальных этапах снижала экспрессию нескольких ключевых генов, участвующих в передаче сигналов Wnt (*CTNNB1*, *FZD1*, *FZD4*, *WNT2B* и *WNT3A*), тогда как в последующем их экспрессия повышалась (Lueck et al., 2020). Снижение экспрессии генов Wnt пути сопровождалось повышением экспрессии GSK3 β и нейрональных/ретиальных маркеров (кальбиндина и кальретинина) (Lueck et al., 2017, 2020).

Активация передачи сигналов Wnt дополнительно контролируется различными антагонистами, включая фактор ингибирования Wnt1 (англ. WNT inhibitory factor 1, WIF1), Cerberus, Sclerostin, а также членов семейств Dickkopf и secreted Frizzled-related protein (sFRP). Белки Sclerostin и Dickkopf влияют на активность Wnt и противодействуют канонической передаче сигналов, связываясь с LRP5 или LRP6, тогда как WIF1, Cerberus и sFRP могут напрямую взаимодействовать с белками Wnt (Bovolenta et al., 2008).

Семейство sFRP является самым большим семейством ингибиторов Wnt белков, которые не просто связывают Wnt, но и могут противодействовать активности друг друга, а также связываться с Fzd-рецепторами, предотвращая взаимодействие Wnt с этими рецепторами. Более того, sFRP белки могут взаимодействовать с другими рецепторами или молекулами ВКМ (например, фибронектином), действовать в качестве ингибиторов BMP1 (Bovolenta et al., 2008) или влиять на направление аксонов ганглиозных клеток сетчатки (Rodríguez et al., 2005).

У человека семейство sFRP включает пять членов богатых цистеином секретрируемых гликопротеинов (около 36 кДа), которые по своей структуре подразделяются на две подгруппы: первая включает sFRP1, sFRP2 и sFRP5, а вторая – sFRP3 и sFRP4 (Esteve et al., 2003; Garcia-Hoyos et al., 2004; Bovolenta et al., 2008). Анализ экспрессии у цыплят, мышей и людей показал, что все члены первой группы экспрессируются как в развивающемся, так и во взрослом глазу. В частности, мРНК sFRP5 локализована в РПЭ человека,

тогда как sFRP1 и sFRP2 экспрессируются в недифференцированном нейроэпителии сетчатки цыплят и мышей (Esteve et al., 2003; Garcia-Hoyos et al., 2004; Bovolenta et al., 2008). По мере развития экспрессия sFRP1 специфически поддерживается во внутреннем ядерном и фоторецепторном слоях, по крайней мере, у мыши (Garcia-Hoyos et al., 2004). На основании этого паттерна экспрессии было предположено, что sFRP1 и sFRP5 могут участвовать в определении полярности фоторецепторных клеток. Кроме того, анализ нескольких случаев пигментного ретинита, при котором фоторецепторы дегенерируют путем апоптоза, выявил связь дегенерации фоторецепторов с повышенной регуляцией sFRP1, sFRP2 и sFRP5 (Jones et al., 2000; Garcia-Hoyos et al., 2004). В отличие от этих наблюдений, в исследовании Стива и соавт., проведенном на цыплятах *in vitro* и *in vivo*, показано, что sFRP1 модулирует клеточную дифференцировку сетчатки, способствуя образованию ганглиозных и фоторецепторных клеток (колбочек) и, в то же время, уменьшая количество амакриновых клеток (Esteve et al., 2003).

Активация канонического Wnt сигнального пути возможна и при воздействии различных факторов роста, в том числе негативно регулирующих GSK3 β . Известно, что TGF- β 1 индуцирует протеолитическое отщепление E-кадгерина, что вызывает ядерную транслокацию β -катенина, индукцию транскрипции Slug и репрессию транскрипции E-кадгерина в различных типах клеток (Zheng et al., 2009). При воздействии TGF- β 1 на клетки ARPE-19 уменьшалась связь между ANXA8 и β -катенином (Lueck et al., 2020).

Механизмы Wnt/ β -катенин сигнального пути способны объяснить многие патологические процессы, происходящие при изменении структуры и функции клеток РПЭ. Исследования в этих направлениях активно ведутся, поскольку помогут понять и регулировать не только механизмы ЭМП клеток РПЭ *in vivo*, но и патологические процессы, происходящих в РПЭ при старении.

Неканонический Wnt сигнальный путь

Интересно, что трансмембранные рецепторные тирозинкиназы ROR2 и RYK, а также Fzd-рецепторы, которые действуют независимо от LRP5 или LRP6, функционируют в качестве рецепторов для Wnt и активируют независимые от β -катенина пути. Это приводит к изменениям в движении и полярности клеток, а также к антагонизму пути β -катенина (Angers, Moon, 2009).

Неканонический Wnt/Ca²⁺ сигнальный путь активируется лигандами Wnt5a и Wnt11. Связывание Wnt5a с Fzd-2 рецептором активирует G-белки, фосфодиэстеразы и изменяет уровень внутриклеточного кальция, что приводит к активации Ca²⁺/кальмо-

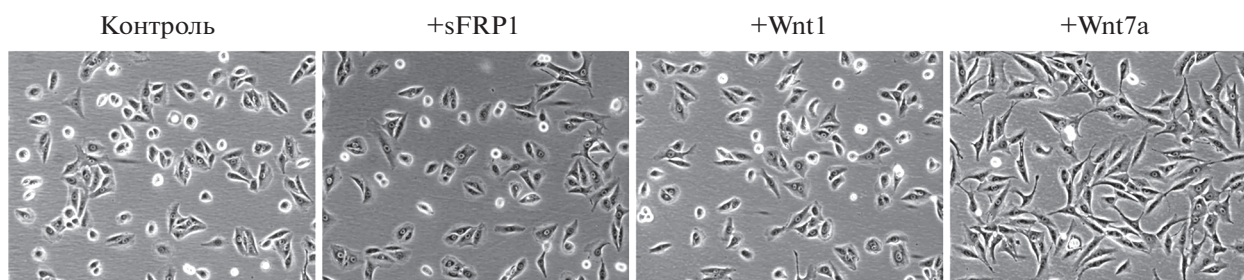


Рис. 3. Неиммortalизованные клетки РПЭ взрослого человека 4 пассажа через 24 ч после воздействия 0.4 мкг/мл sFRP1, 2 нг/мл Wnt1 или 60 нг/мл Wnt7a по сравнению с контролем (без добавления факторов). Фазовый контраст, $\times 100$.

дулинзависимых киназ (Naskam, 2005). Существуют также доказательства того, что путь Wnt/Ca²⁺ может противодействовать каноническому пути, повышая интригуемые возможности коммуникации и регуляции обратной связи между путями.

Метод “кальциевого выключения” на культуре клеток РПЭ взрослого человека выявил связь между кальций-зависимой адгезией, морфогенезом и пигментацией. Обратимый, зависящий от уровня кальция в ростовой среде, характер изменений в морфологии клеток, заключался в переходе от эпителиального фенотипа с пигментацией к веретенообразным клеткам без пигмента и наоборот (Rak et al., 2006).

Известно, что *неканонический Wnt/PCP сигнальный путь* стимулируется под действием лигандов Wnt5a, -5b, -7a, -11. В зависимости от клеточного контекста Wnt/PCP путь может активироваться и лигандами Wnt, которые обычно активируют β -катенин-зависимый путь (Daulat, Borg, 2017). Этот путь контролирует активность малых ГТФ-аз семейства Rho (Rac1 и RhoA). Рас-зависимый сигнальный каскад связан с индукцией киназной активности JNK, а Rho-зависимая ветвь сигнального каскада – с активацией ROCK. ROCK вовлечена в регуляцию процесса модификации структур актинового цитоскелета, благодаря чему оказывает значительное влияние на поляризацию и подвижность клеток (Daulat, Borg, 2017).

Однако о влиянии вышеперечисленных Wnt лигандов на клетки РПЭ в настоящее время известно мало. Например, показано, что Wnt5a подавлял каноническую передачу сигналов Wnt в клетках ARPE-19 путем фосфорилирования и деградации β -катенина. Кроме того, Wnt5a снижал уровни VEGF, TNF- α и NF- κ B, активированные с помощью Wnt3a. Более того, Wnt5a увеличивал экспрессию E-кадгерина и снижал миграцию клеток за счет подавления экспрессии Snail, тем самым отменяя Wnt3a-индуцированный ЭМП в клетках РПЭ человека (Kim et al., 2015).

Недавно нами на клетках РПЭ взрослого человека ранних пассажей и линии ARPE-19 показано, что среди изученных белков Wnt сигнального пути (Wnt1, Wnt7a и sFRP1) только Wnt7a оказывал видимые биологические эффекты (неопубликованные данные) (рис. 3). Wnt7a ингибировал пролиферативную активность клеток РПЭ по данным МТТ-анализа, способствовал появлению клеток большего размера по данным морфометрического исследования и увеличивал экспрессию мРНК *KLF4* (Kuznetsova et al., 2015, 2016) (рис. 4), что вместе свидетельствует в пользу негативной регуляции клеточного цикла после воздействия Wnt7a. Из данных литературы известно, что *KLF4* участвует в контроле пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток (Chen et al., 2003; Tien et al., 2015). Однако сведения об его участии в регуляции пролиферативного ответа клеток противоречивы. По всей видимости, в зависимости от контекста *KLF4* может регулировать клеточный цикл либо негативно (Chen et al., 2003; Li et al., 2012), либо позитивно (Tien et al., 2015). Авторы негативной теории предполагают, что конститутивный уровень *KLF4* ингибирует пролиферацию, миграцию и адгезию клеток, а потеря *KLF4*, наоборот, способствует пролиферации (Chen et al., 2003; Li et al., 2012).

В нашем исследовании, Wnt7a инициировал процесс распластывания клеток РПЭ на пластике, активировал процессы редифференцировки, о чем свидетельствует усиление экспрессии РПЭ-специфичных генов (*RPE65*, *MITF* и *OTX2*) (рис. 4). При этом было отмечено отсутствие окрашивания на MAP1B и β III-тубулин при одновременном увеличении интенсивности свечения антител к синапсину I и NF 68 и 200 кДа, белкам-маркерам зрелых нейронов, и увеличение экспрессии мРНК *PAX6*, маркера нейронов сетчатки, что вместе указывает на продвижение нейрональной/ретикулярной дифференцировки или понижения уровня дифференцировки клеток (Kuznetsova et al., 2015; Kuznetsova et al., 2016). Отсутствие β III-тубулина на белковом уровне и сохранение его на тран-

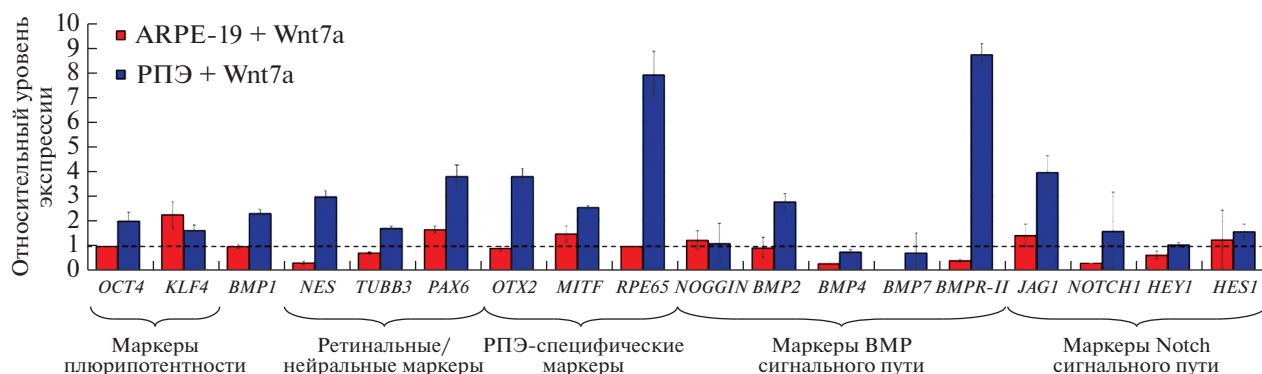


Рис. 4. кПЦР. Уровень экспрессии мРНК ряда генов в клетках ARPE-19 (красные столбики) и неиммortalизованных клетках РПЭ взрослого человека 4 пассажа (синие столбики) через 24 ч после воздействия 60 нг/мл Wnt7a относительно соответствующего контроля (в отсутствии Wnt7a), принятого за единицу (штриховая линия). Вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

скрипционном уровне согласуется с результатами Хорн и соавт. (Horn et al., 2007). Исследователи на эмбрионах трансгенных мышей показали, что гиперэкспрессия Wnt7a отсрочивает экспрессию белка β III-тубулина и это способствует контролю созреванию нейрональных прогениторов (Horn et al., 2007). В дополнение к этому, в нашем исследовании, отдельные группки клеток РПЭ окрашивались на нестин, что совместно с увеличением уровней экспрессии мРНК *NES*, гена-плюрипотентности *OCT4* и лиганда Notch сигнального пути *JAG1* говорит о поддержании пула нейральных/ретиальных стволовых клеток (Kuznetsova et al., 2016). Повышение BMP1 на транскрипционном уровне в клетках РПЭ под воздействием Wnt7a (рис. 4) не сопровождалось повышением его на уровне белка, что говорит об отсутствии развертывания ЭМП и свидетельствует в пользу данных о редифференцировке клеток РПЭ. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что *in vitro* клетки РПЭ оказываются на разных стадиях дедифференцировки и, следовательно, реагируют на воздействие Wnt7a различно: в одних клетках запускается процесс редифференцировки/эпителиальной дифференцировки, тогда как в других – нейральной/ретиальной дифференцировки или дедифференцировки.

Кроме того, под воздействием Wnt7a было отмечено перераспределение синапсина I с перинуклеарного точечного на цитоплазматическое (Kuznetsova et al., 2016) и изменение локализации и снижение интенсивности свечения антител к фокальной адгезивной киназе (англ. focal adhesion kinase, FAK) (неопубликованные данные). Известно, что синапсин I и FAK участвуют в связывании микротрубочек (Valtorta et al., 1992; Schaller, 2010). В исследовании Бустос и соавт. показано, что синапсин I присутствует в эпителиальных клетках ненейронного происхождения, он

концентрируется в везикулярном компартменте, прилегающем к транс-элементам комплекса Гольджи, который также обогащен миозином II (Bustos et al., 2001). *In vitro* синапсин I взаимодействует с различными компонентами цитоматрикса (F-актином, микротрубочками, нейрофиламентами и спектрином), опосредуя прикрепление везикул к цитоскелету и регулируя их движение внутри клетки (Valtorta et al., 1992). Нерцепторная тирозинкиназа FAK играет важную роль в регуляции актинового цитоскелета, клеточной адгезии, миграции, пролиферации и выживания клеток, а также подтверждена роль FAK в контроле микротрубочек и в выполнении важных функций в ядре (Schaller, 2010). Таким образом, отсутствие окрашивания на MAP1B и β III-тубулин при изменении характера окрашивания на синапсин I и FAK под воздействием Wnt7a в исследовании (Kuznetsova et al., 2016) согласуется с утверждением о деполимеризации микротрубочек при этом.

Как уже было сказано выше, неканонический Wnt/PCP сигнальный путь контролирует RhoA/ROCK сигнальный каскад, активация которого коррелирует с дестабилизацией микротрубочек (Chen et al., 2012b). Кроме того, как показано в работе Лу и соавт. на клетках HaCaT, деполимеризация микротрубочек способствует увеличению размера ядра (Lu et al., 2012). В нашем исследовании мы также наблюдали увеличение размера ядер клеток РПЭ при воздействии Wnt7a (неопубликованные данные).

Следует отметить, что трансформированные клетки линии ARPE-19 оказались менее чувствительны к воздействию Wnt7a, чем неиммortalизованные (собственные наблюдения) (рис. 4). Хотя морфологические и молекулярные изменения в клетках РПЭ взрослого человека, вызванные Wnt7a, носят краткосрочный характер, поскольку белок функционирует как сигнал ближнего действия между соседними клетками, а также из-за

отсутствия подходящего микроокружения, Wnt7a можно рассматривать в качестве потенциального терапевтического агента.

Дальнейшее изучение Wnt сигнального пути и механизмов его регулирования даст возможность понять процессы, происходящие с клетками РПЭ при патологии, и использовать эти знания для разработки лекарственных средств нового поколения.

Вышеперечисленные Wnt сигнальные пути являются Fzd-зависимыми, в последнее время стали появляться данные о существовании Fzd-независимых путей.

NOTCH СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

Notch сигнальный путь является эволюционно высоко консервативным сигнальным механизмом, который управляет клеточной пролиферацией и решениями клеточной судьбы. В отличие от таких сигнальных путей, как TGF- β /BMP, Wnt и Hh, передача сигналов Notch происходит посредством межклеточной коммуникации, где трансмембранные лиганды на одной клетке активируют трансмембранные рецепторы на расположенной рядом клетке (Siebel, Lendahl, 2017). Известно, что у млекопитающих имеется 5 трансмембранных лигандов (Jagged (Jag) 1 и 2, Delta-like (DLL) 1, 3 и 4) и 4 рецептора Notch (1–4). В нейrogenезе участвует Notch1 и Notch2, в то время как в эндотелиальных клетках сосудов преимущественно экспрессируется Notch4 (Iso et al., 2003).

Рецептор Notch синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и транспортируется к плазматической мембране. Взаимодействие рецептора с трансмембранным лигандом на соседней клетке приводит к двум последовательным протеолитическим реакциям. Первое расщепление производится внеклеточно с помощью металлопротеиназы Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE)/ A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM), обеспечивающей удаление внеклеточного домена Notch рецептора (англ. Notch extracellular domain, NECD). Закрепленный в мембране С-терминальный фрагмент, который остается после первого расщепления, подвергается конформационному изменению. В результате этого активируется прилегающая к мембране специфическая протеаза, γ -секретеза (англ. γ -secretase). Такое внутримембранное расщепление высвобождает внутриклеточный домен Notch (англ. Notch intracellular domain, Notch-ICD), который транслоцируется в ядро клетки (Siebel, Lendahl, 2017). Показано, что апикальный белок CRB2 человека ингибируют расщепление Notch1 и передачу сигналов путем связывания с пресенилиновым комплексом (англ. presenilin complex), ингибируя активность γ -секретезы (Mitsuishi et al., 2010).

В ядре клетки NotchICD взаимодействует с транскрипционным фактором CSL (сокращение от CBF1 (C promoter binding factor 1) у человека, RBP-Jk (Recombining binding protein for immunoglobulin kappa J region) у грызунов, Su(H) (Suppressor of Hairless) у дрозофил и Lag-1 (Longevity-assurance gene-1) у нематод) для регуляции транскрипции нижестоящих генов (MHC I класса, CD23, IL-6, β -глобин, ErbB2, NF- κ B2, CCND1, C-MYC, p27^{KIP1}, гены семейств HES (Hairy-enhancer-of-split) и HEY (Hairy-enhancer-of-split related with YRPW motif) (Andersson et al., 2011; Faló-Sanjuan, Bray, 2020). В результате происходит регуляция пролиферации, дифференцировки, апоптоза и самоподдержания стволовых клеток, что сильно зависит от контекста и типа клеток (Siebel, Lendahl, 2017).

Гены семейств HES и HEY кодируют ядерные белки, относящиеся к классу транскрипционных факторов с основным доменом bHLH. Из семи членов семейства генов HES в поддержании стволовых и прогениторных клеток через ингибирование дифференцировки участвуют гены HES1, HES5 и HES7, из семейства HEY – HEY1, HEY2 и HEYL (Siebel, Lendahl, 2017). Потеря апикальных белков CRB1 и CRB2 в сетчатке мышей, имитирующая врожденный амавроз Лебера человека, приводила к нарушению регуляции генов-мишеней Notch1 (Hey1 и Heyl) и YAP/Hippo сигнальных путей и повышению уровня p120-катенина, что сопровождалось изменением хода клеточного цикла и увеличением числа митотических клеток (Pellissier et al., 2013).

Имеющиеся данные о роли сигнального пути Notch в регуляции дифференцировки РПЭ получены только на модельных животных. Показано, что на ранних стадиях эмбрионального развития мышцы Hes1 экспрессируется в формирующихся хрусталиках, глазных пузырях и пигментированном эпителии и необходим для правильного роста, морфогенеза и дифференцировки этих тканей (Варо, Серко, 1997; Lee et al., 2005). Активация Notch сигнального пути в эмбриональном развитии мышцы приводит к гиперпролиферации и злокачественным новообразованиям в клетках РПЭ у взрослого животного (Schouwey et al., 2011).

In vitro блокирование передачи сигнала Notch ингибирует миграцию и пролиферацию клеток ARPE-19 и снижает уровни экспрессии генов-мишеней передачи сигналов Notch, включая HES1, C-MYC, HEY2 и SOX9 (Liu et al., 2013).

Как было отмечено ранее, передача сигналов Notch может перекрестно взаимодействовать как с каноническими Smad-зависимыми, так и с неканоническими путями передачи сигналов TGF- β в клетках РПЭ в течение ЭМП (Chen et al., 2014a). Кроме того, показано, что ключевые участники сигнального пути Notch, включая JAG1, NOTCH3, HES1 и HEY1, активируются в клетках РПЭ чело-

века после воздействия TGF- β 2, тогда как блокада этого пути с помощью DAPT полностью обращает TGF- β 2-индуцированный ЭМП (Chen et al., 2014a).

Тесным союзником Notch является сигнальный путь Wnt, их взаимодействия происходят на многих уровнях, включая физическое взаимодействие между NotchICD и ключевыми регуляторами Wnt пути, а также фосфорилирование Notch-ICD с помощью GSK3 β (Glazer et al., 2008; Siebel, Lendahl, 2017).

Notch сигнальный путь взаимодействует не только с TGF- β /BMP и Wnt, но существуют доказательства его совместной работы с другими путями, такими как Hh и NF- κ B (Schouwey, Beermann, 2008).

Однако роль этой совместной работы в фенотипических изменениях РПЭ мало изучена. Нацеливание на передачу сигналов Notch может обеспечить новый подход к лечению офтальмологических заболеваний, связанных с клетками РПЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РПЭ выполняет ряд важных функций, необходимых для поддержания структурной целостности хориокапилляров и фоторецепторов. В результате разрыва сетчатки клетки РПЭ подвергаются действию сыворотки крови или стекловидного тела, которые содержат множество факторов роста, цитокинов и хемокинов, которые активируют клетки РПЭ, подвергая их ЭМП. ЭМП клеток РПЭ и функциональная дегенерация этих клеток способствуют развитию нескольких заболеваний сетчатки, включая ПВР и ВМД. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе ЭМП в клетках РПЭ, остаются неуловимыми. Поиск факторов, регулирующих дифференцировку РПЭ, несомненно, представляет фундаментальный и прикладной интерес. В этом обзоре сделан акцент на роли основных сигнальных путей, включая TGF- β /BMP, FGF2/FGFR, Wnt и Notch пути, в регуляции клеточных и молекулярных механизмов дедифференцировки РПЭ и ЭМП, которые были в значительной степени определены при изучении эффектов различных сигнальных молекул *in vitro*. Ряд исследований показал, что зрелые клетки РПЭ *in vitro* подвергаются дедифференцировке, они теряют межклеточный контакт и пигментацию, пролиферируют и экспрессируют маркеры, не характерные для РПЭ, что приводит к изменению фенотипа клеток. Экспрессия нейральных/ретиальных маркеров в нейроэпителиальных клетках РПЭ *in vitro* указывает на снижение клеточной дифференцировки. Важно отметить, что клетки РПЭ *in vitro* не теряют полностью своих эпителиальных свойств. Эта предполагаемая пластичность означает, что клетки могут задер-

живаться на промежуточных стадиях и что они могут подвергаться частичному ЭМП, отражая то, что происходит *in vivo*. Регуляция мезенхимальной пластичности и дедифференцировки клеток РПЭ при развитии пролиферативных витреоретинальных заболеваний и при трансплантации клеток РПЭ, полученных из ESCs и iPSCs, является важной задачей как для разработки специфической терапии ПВР, так и для широкомасштабного использования клеток РПЭ в регенеративной медицине.

Как следует из приведенных выше данных, значительное количество внеклеточных факторов и внутриклеточных медиаторов играет важную роль в ЭМП клеток РПЭ и может выступать в качестве потенциальных мишеней при лечении ПВР. Тем не менее, остаются серьезные вопросы об ЭМП в клетках РПЭ. Поскольку большинство экспериментов по ЭМП клеток РПЭ основано на клеточных моделях и, в частности, на ARPE-19 линии, все еще трудно проанализировать относительный вклад ЭМП клеток РПЭ при ПВР. Кроме того, требуется осторожность при экстраполяции результатов, полученных в культуральной модели *in vitro*, на сложную среду живой сетчатки. Помимо клеток РПЭ в патогенезе ПВР участвуют и другие типы клеток, например гиалоциты и глиальные клетки, которые также вносят вклад в производство матрикса и фиброз. Кроме того, клетки РПЭ и сетчатки имеют разные метаболические пути, поэтому фармакологическое ингибирование дедифференцировки и пролиферации клеток РПЭ, может оказаться неблагоприятным для нейральной сетчатки. В дополнение к этому, поскольку ЭМП является лишь одним из признаков патогенеза ПВР, другие патологические изменения, способствующие ПВР, также требуют внимания.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе дедифференцировки клеток РПЭ, и путей их регуляции требует продолжения. Кроме того, интересно изучить и другие пути, которые участвуют в регенерации сетчатки, в том числе Shh. Это необходимо для более глубокого понимания этиопатогенеза патологий РПЭ и для определения новых мишеней, вовлеченных в процесс повреждения РПЭ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность А.М. Куринову за проведение КПЦР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adjianto J., Castorino J.J., Wang Z.X. et al.* Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 24. P. 20491–20503.
- Ambati J., Atkinson J.P., Gelfand B.D.* Immunology of age-related macular degeneration // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. V. 13. № 6. P. 438–451.
- Ambati J., Fowler B.J.* Mechanisms of age-related macular degeneration // *Neuron.* 2012. V. 75. № 1. P. 26–39.
- Amemiya K., Haruta M., Takahashi M. et al.* Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 316. № 1. P. 1–5.
- Amin R., Puklin J.E., Frank R.N.* Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994. V. 35. № 8. P. 3178–3188.
- Anderson D.H., Guerin C.J., Hageman G.S. et al.* Distribution of transforming growth factor- β isoforms in the mammalian retina // *J. Neurosci. Res.* 1995. V. 42. № 1. P. 63–79.
- Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U.* Notch signaling: Simplicity in design, versatility in function // *Development.* 2011. V. 138. № 17. P. 3593–3612.
- Angers S., Moon R.T.* Proximal events in Wnt signal transduction // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 7. P. 468–477.
- Arnaud E., Touriol C., Boutonnet C. et al.* A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. № 1. P. 505–514.
- Bakiri L., MacHo-Maschler S., Custic I. et al.* Fra-1/AP-1 induces EMT in mammary epithelial cells by modulating Zeb1/2 and TGF β expression // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. № 2. P. 336–350.
- Banerjee S., Savant V., Scott R.A.H. et al.* Multiplex bead analysis of vitreous humor of patients with vitreoretinal disorders // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 5. P. 2203–2207.
- Bao Z.Z., Cepko C.L.* The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 4. P. 1425–1434.
- Baudouin C., Fredj-Reygrobellet D., Brignole F. et al.* Growth factors in vitreous and subretinal fluid cells from patients with proliferative vitreoretinopathy // *Ophthalmic Res.* 1993. V. 25. № 1. P. 52–59.
- Bharti K., Nguyen M.-T.T., Skuntz S. et al.* The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. № 5. P. 380–394.
- Boles N.C., Fernandes M., Swigut T. et al.* Epigenomic and transcriptomic changes during human RPE EMT in a stem cell model of epiretinal membrane pathogenesis and prevention by nicotinamide // *Stem Cell Reports.* 2020. V. 14. № 4. P. 631–647.
- Bost L.M., Hjelmeland L.M.* Cell density regulates differential production of bFGF transcripts // *Growth Factors.* 1993. V. 9. № 3. P. 195–203.
- Boureaux A., Vignal E., Faure S., Fort P.* Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 1. P. 203–216.
- Bovolenta P., Esteve P., Ruiz J.M. et al.* Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. № 6. P. 737–746.
- Bragdon B., Moseychuk O., Saldanha S. et al.* Bone morphogenetic proteins: a critical review // *Cell. Signal.* 2011. V. 23. № 4. P. 609–620.
- Buchholz D.E., Pennington B.O., Croze R.H. et al.* Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium // *Stem Cells Transl. Med.* 2013. V. 2. № 5. P. 384–393.
- Bustelo X.R., Sauzeau V., Berenjano I.M.* GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo* // *BioEssays.* 2007. V. 29. № 4. P. 356–370.
- Bustos R., Kolen E.R., Braiterman L. et al.* Synapsin I is expressed in epithelial cells: localization to a unique trans-Golgi compartment // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114. № 20. P. 3695–3704.
- Caputto B.L., Cardozo Gizzi A.M., Gil G.A.* c-Fos: An AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2014. V. 1841. № 9. P. 1241–1246.
- Carr A.J., Vugler A.A., Yu L. et al.* The expression of retinal cell markers in human retinal pigment epithelial cells and their augmentation by the synthetic retinoid fenretinide // *Mol. Vis.* 2011. V. 17. P. 1701–1715.
- Casco-Robles M.M., Islam M.R., Inami W. et al.* Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts // *Sci. Rep.* 2016. V. 6.
- Chen H.C., Zhu Y.T., Chen S.Y., Tseng S.C.* Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition // *Lab. Invest.* 2012a. V. 92. № 5. P. 676–687.
- Chen H.C., Zhu Y.T., Chen S.Y., Tseng S.C.G.* Selective activation of p120ctn-Kaiso signaling to unlock contact inhibition of ARPE-19 cells without epithelial-mesenchymal transition // *PLoS One.* 2012b. V. 7. № 5.
- Chen S., Yuan M., Liu Y. et al.* Landscape of microRNA in the aqueous humour of proliferative diabetic retinopathy as assessed by next-generation sequencing // *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 2019. V. 47. № 7. P. 925–936.
- Chen X., Whitney E.M., Gao S.Y., Yang V.W.* Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. № 3. P. 665–677.
- Chen X., Xiao W., Wang W. et al.* The complex interplay between ERK1/2, TGF β /Smad, and Jagged/Notch sig-

- naling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *PLoS One*. 2014a. V. 9. № 5. P. e96365.
- Chen X., Ye S., Xiao W. *et al.* Differentially expressed microRNAs in TGF β 2-induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *Int. J. Mol. Med*. 2014b. V. 33. № 5. P. 1195–1200.
- Chen Y.J., Tsai R.K., Wu W.C. *et al.* Enhanced PKC δ and ERK signaling mediate cell migration of retinal pigment epithelial cells synergistically induced by HGF and EGF // *PLoS One*. 2012c. V. 7. № 9. P. e44937.
- Cheng H.-C., Ho T.-C., Chen S.-L. *et al.* Troglitazone suppresses transforming growth factor beta-mediated fibrogenesis in retinal pigment epithelial cells // *Mol. Vis*. 2008. V. 14. P. 95–104.
- Chiba C. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration // *Exp. Eye Res*. 2014. V. 123. P. 107–114.
- Chiba C., Mitashov V. Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human* / Eds. Chiba C., Mitashov V. Trivandrum, India: Research Signpost, 2007. C. 15–33.
- Chien H.W., Wang K., Chang Y.Y. *et al.* Kaempferol suppresses cell migration through the activation of the ERK signaling pathways in ARPE-19 cells // *Environ. Toxicol*. 2019. V. 34. № 3. P. 312–318.
- Choudhary P., Dodsworth B.T., Sidders B. *et al.* A FOXM1 dependent mesenchymal-epithelial transition in retinal pigment epithelium cells // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 6. P. e0130379.
- Chung E.J., Chun J.N., Jung S.A. *et al.* TGF- β -stimulated aberrant expression of class III β -tubulin via the ERK signaling pathway in cultured retinal pigment epithelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2011. V. 415. № 2. P. 367–372.
- Connor T.B., Roberts A.B., Sporn M.B. *et al.* Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye // *J. Clin. Invest*. 1989. V. 83. № 5. P. 1661–1666.
- Cook B., Lewis G.P., Fisher S.K., Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1995. V. 36. № 6. P. 990–996.
- Corral R.D. del, Olivera-Martinez I., Goriely A. *et al.* Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension // *Neuron*. 2003. V. 40. № 1. P. 65–79.
- Cui L., Lyu Y., Jin X. *et al.* miR-194 suppresses epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by directly targeting ZEB1 // *Ann. Transl. Med*. 2019. V. 7. № 23. P. 751.
- Daulat A.M., Borg J.-P. Wnt/planar cell polarity signaling: new opportunities for cancer treatment // *Trends in Cancer*. 2017. V. 3. № 2. P. 113–125.
- Deji Q.Z., Yan F., Zhaba W.D. *et al.* Cross-talk between microRNA-let7c and transforming growth factor- β 2 during epithelial-to-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Ophthalmol*. 2020. V. 13. № 5. P. 693–700.
- Ding V.M.Y., Ling L., Natarajan S. *et al.* FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3 β signaling // *J. Cell. Physiol*. 2010. V. 225. № 2. P. 417–428.
- Donato L., Bramanti P., Scimone C. *et al.* miRNA expression profile of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress conditions // *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8. № 2. P. 219–233.
- Dudley A.T., Lyons K.M., Robertson E.J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye // *Genes Dev*. 1995. V. 9. № 22. P. 2795–2807.
- Dvashi Z., Goldberg M., Adir O. *et al.* TGF- β 1 induced transdifferentiation of RPE cells is mediated by TAK1 // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 4.
- El-Ghrably I.A., Dua H.S., Orr G.M. *et al.* Intravitreal invading cells contribute to vitreal cytokine milieu in proliferative vitreoretinopathy // *Br. J. Ophthalmol*. 2001. V. 85. № 4. P. 461–470.
- Engelhardt M., Bogdahn U., Aigner L. Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin // *Brain Res*. 2005. V. 1040. № 1–2. P. 98–111.
- Esser P., Weller M., Bresgen M. *et al.* The effects of basic fibroblast growth factor on bovine retinal pigment epithelium in vitro // *Ger. J. Ophthalmol*. 1992. V. 1. № 1. P. 58–61.
- Esteve P., Trousse F., Rodríguez J., Bovolenta P. SFRP1 modulates retina cell differentiation through a β -catenin-independent mechanism // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. № 12. P. 2471–2481.
- Evans P.M., Chen X., Zhang W., Liu C. KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin. // *Mol. Cell. Biol*. 2010. V. 30. № 2. P. 372–381.
- Falo-Sanjuan J., Bray S.J. Decoding the Notch signal // *Dev. Growth Differ*. 2020. V. 62. № 1. P. 4–14.
- Fasler-Kan E., Wunderlich K., Hildebrand P. *et al.* Activated STAT3 in choroidal neovascular membranes of patients with age-related macular degeneration // *Ophthalmologica*. 2005. V. 219. № 4. P. 214–221.
- Ferguson H.R., Smith M.P., Francavilla C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and noncanonical partners in cancer signaling // *Cells*. 2021. V. 10. № 5. P. 1201.
- Finnemann S.C., Chang Y. Photoreceptor–RPE interactions // *Visual Transduction and Non-Visual Light Perception*. Humana Press, 2008. P. 67–86.
- Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117. № 3. P. 576–586.
- Fuchs H.R., Meister R., Lotke R., Framme C. The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFB-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // *Exp. Eye Res*. 2020. V. 201. P. 108258.
- Fuhrmann S., Zou C.J., Levine E.M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis // *Exp. Eye Res*. 2014. V. 123. P. 141–150.
- Fujimura N., Taketo M.M., Mori M. *et al.* Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium // *Dev. Biol*. 2009. V. 334. № 1. P. 31–45.

- Furuta Y., Hogan B.L.M.* BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 23. P. 3764–3775.
- Galy A., Néron B., Planque N. et al.* Activated MAPK/ERK kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina // *Dev. Biol.* 2002. V. 248. № 2. P. 251–264.
- Ganti R., Hunt R.C., Parapuram S.K., Hunt D.M.* Vitreous modulation of gene expression in low-passage human retinal pigment epithelial cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 4. P. 1853–1863.
- Garcia-Hoyos M., Cantalapiedra D., Arroyo C. et al.* Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies // *Mol. Vis.* 2004. V. 10. P. 426–431.
- Geller S.F., Lewis G.P., Fisher S.K.* FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Müller and RPE cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. № 6. P. 1363–1369.
- Ghosh S., Shang P., Terasaki H. et al.* A role for β A3/A1-crystallin in type 2 EMT of RPE cells occurring in dry age-related macular degeneration // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018. V. 59. № 4. P. AMD104–AMD113.
- Glazer R.I., Wang X.Y., Yuan H., Yin Y.* Musashil: a stem cell marker no longer in search of a function // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 17. P. 2635–2639.
- Go Y.M., Zhang J., Fernandes J. et al.* MTOR-initiated metabolic switch and degeneration in the retinal pigment epithelium // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 9. P. 12502–12520.
- Gonzalez D.M., Medici D.* Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition // *Sci. Signal.* 2014. V. 7. № 344. P. re8.
- Grisanti S., Guidry C.* Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995. V. 36. № 2. P. 391–405.
- Györfi A.H., Matei A.E., Distler J.H.W.* Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis // *Matrix Biol.* 2018. V. 68–69. P. 8–27.
- Hackam A.S.* The Wnt signaling pathway in retinal degenerations // *IUBMB Life.* 2005. V. 57. № 6. P. 381–388.
- Hageman G.S., Kirchoff-Rempe M.A., Lewis G.P. et al.* Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. V. 88. № 15. P. 6706–6710.
- Hardwick C., Feist R., Morris R. et al.* Tractional force generation by porcine Müller cells: stimulation by growth factors in human vitreous // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997. V. 38. № 1. P. 2053–2063.
- Hazim R.A., Volland S., Yen A. et al.* Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide // *Exp. Eye Res.* 2019. V. 179. P. 18–24.
- Heij E.C. La, Waarenburg M.P.H. Van De, Blaauwgeers H.G.T. et al.* Basic fibroblast growth factor, glutamine synthetase, and interleukin-6 in vitreous fluid from eyes with retinal detachment complicated by proliferative vitreoretinopathy // *Am. J. Ophthalmol.* 2002. V. 134. № 3. P. 367–375.
- Hernández C., Burgos R., Cantón A. et al.* Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: A case-control study // *Diabetes Care.* 2001. V. 24. № 3. P. 516–521.
- Horn Z., Papachristou P., Shariatmadari M. et al.* Wnt7a overexpression delays beta-tubulin III expression in transgenic mouse embryos // *Brain Res.* 2007. V. 1130. № 1. P. 67–72.
- Huang L., Zhang C., Su L., Song Z.* GSK3 β attenuates TGF- β 1 induced epithelial–mesenchymal transition and metabolic alterations in ARPE-19 cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 486. № 3. P. 744–751.
- Huang X., Wei Y., Ma H., Zhang S.* Vitreous-induced cytoskeletal rearrangements via the Rac1 GTPase-dependent signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 419. № 2. P. 395–400.
- Hunt D.M., Chen W.H., Hunt R.C.* Vitreous treatment of retinal pigment epithelial cells results in decreased expression of FGF-2 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. V. 39. № 11. P. 2111–2120.
- Huynh L.K., Hipolito C.J., Dijke P. Ten.* A perspective on the development of TGF- β inhibitors for cancer treatment // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 11.
- Idelson M., Alper R., Obolensky A. et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 5. № 4. P. 396–408.
- Ishikawa K., He S., Terasaki H. et al.* Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy // *Sci. Rep.* 2015. V. 5.
- Iso T., Kedes L., Hamamori Y.* HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway // *J. Cell. Physiol.* 2003. V. 194. № 3. P. 237–255.
- Jaime-Soguero A. de, Abreu de Oliveira W., Lluís F.* The pleiotropic effects of the canonical Wnt pathway in early development and pluripotency // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 2. P. pii:E93.
- Jayaram H., Phillips J.I., Lozano D.C. et al.* Comparison of MicroRNA expression in aqueous humor of normal and primary open-angle glaucoma patients using PCR arrays: a pilot study // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2017. V. 58. № 7. P. 2884.
- Jiang C., Xie P., Sun R. et al.* C-Jun-mediated microRNA-302d-3p induces RPE dedifferentiation by targeting p21Waf1/Cip1 article // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 5.
- Jones S.E., Jomary C., Grist J. et al.* Modulated expression of secreted Frizzled-related proteins in human retinal degeneration // *Neuroreport.* 2000. V. 11. № 18. P. 3963–3967.
- Jun J.H., Joo C.K.* MicroRNA-124 controls transforming growth factor β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium by targeting RHOG // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016. V. 57. № 1. P. 12–20.
- Kashani A.H., Lebkowski J.S., Rahhal F.M. et al.* A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 435. P. eaao4097.
- Katoh M., Katoh M.* Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and

- SNAIL signaling cascades // *Cancer Biol. Ther.* 2006. V. 5. № 9. P. 1059–1064.
- Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J.* Class III β -tubulin in human development and cancer // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2003. V. 55. № 2. P. 77–96.
- Katsura Y., Okano T., Noritake M. et al.* Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders // *Diabetes Care.* 1998. V. 21. № 10. P. 1759–1763.
- Kauppinen A., Paterno J.J., Blasiak J. et al.* Inflammation and its role in age-related macular degeneration // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 9. P. 1765–1786.
- Khaliq A., Jarvis-Evans J., McLeod D., Boulton M.* Oxygen modulates the response of the retinal pigment epithelium to basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor by receptor regulation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996. V. 37. № 2. P. 436–443.
- Khera S., Tiwari A., Srinivasan R. et al.* Molecular and morphological evidence for cadaver vitreous-stimulated transformation of differentiation-competent retinal pigment epithelial cells into neuron-like cells // *Curr. Eye Res.* 2012. V. 37. № 7. P. 606–616.
- Kim J.H., Park S., Chung H., Oh S.* Wnt5a attenuates the pathogenic effects of the Wnt/ β -catenin pathway in human retinal pigment epithelial cells via down-regulating β -catenin and Snail // *BMB Rep.* 2015. V. 48. № 9. P. 525–530.
- Kim S.J., Kim Y.S., Kim J.H. et al.* Activation of ERK1/2-mTORC1-NOX4 mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and fibrosis in retinal pigment epithelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 529. № 3. P. 747–752.
- Kita T., Hata Y., Arita R. et al.* Role of TGF- β in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 45. P. 17504–17509.
- Kita T., Hata Y., Kano K. et al.* Transforming growth factor- β 2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: Possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of rho kinase inhibitor // *Diabetes.* 2007a. V. 56. № 1. P. 231–238.
- Kita T., Hata Y., Miura M. et al.* Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells // *Diabetes.* 2007b. V. 56. № 5. P. 1421–1428.
- Kole C., Klipfel L., Yang Y. et al.* Otx2-genetically modified retinal pigment epithelial cells rescue photoreceptors after transplantation // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 1. P. 219–237.
- Komiya Y., Habas R.* Wnt signal transduction pathways // *Organogenesis.* 2008. V. 4. № 2. P. 68–75.
- Kutty R.K., Samuel W., Boyce K. et al.* Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function // *Mol. Vis.* 2016. V. 22. P. 1156–1168.
- Kuznetsova A., Aleksandrova M., Kurinov A. et al.* Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2016. V. 9. № 11. P. 20892–20906.
- Kuznetsova A. V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A.* Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* 2014. V. 2014. P. 1–18.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Chentsova E.V. et al.* Effect of hrWnt7a on human retinal pigment epithelial cells *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 534–540.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A.* Mechanisms of dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. Morphological and molecular genetic analysis // *Cell Tissue Biol.* 2019a. V. 13. № 2. P. 107–119.
- Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A.* Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // *Cell Tissue Biol.* 2019b. V. 13. № 4. P. 292–304.
- Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A.* Human adult retinal pigment epithelial cells as potential cell source for retina recovery // *Cell Tissue Biol.* 2011. V. 5. № 5. P. 495–502.
- Kvanta A.* Expression and secretion of transforming growth factor- β in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells // *Ophthalmic Res.* 1994. V. 26. № 6. P. 361–367.
- Lad E.M., Cheshier S.H., Kalani M.Y.S.* Wnt-signaling in retinal development and disease // *Stem Cells Dev.* 2009. V. 18. № 1. P. 7–16.
- Lam J.K.W., Chow M.Y.T., Zhang Y., Leung S.W.S.* siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing // *Mol. Ther. – Nucleic Acids.* 2015. V. 4. № 9. P. e252.
- Lee H., O'Meara S.J., O'Brien C., Kane R.* The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 9. P. 4291–4299.
- Lee H.Y., Wroblewski E., Philips G.T. et al.* Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation // *Dev. Biol.* 2005. V. 284. № 2. P. 464–478.
- Lee J., Ko M., Joo C.-K.* Rho plays a key role in TGF-beta1-induced cytoskeletal rearrangement in human retinal pigment epithelium // *J. Cell. Physiol.* 2008. V. 216. № 2. P. 520–526.
- Lei H., Rheaume M.-A., Kazlauskas A.* Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy // *Exp. Eye Res.* 2010. V. 90. № 3. P. 376–381.
- Li H., Wang H., Wang F. et al.* Snail involves in the transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e23322.
- Li J., Zheng H., Yu F. et al.* Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis // *Carcinogenesis.* 2012. V. 33. № 6. P. 1239–1246.
- Li M., Li H., Liu X. et al.* MicroRNA-29b regulates TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 // *Exp. Cell Res.* 2016. V. 345. № 2. P. 115–124.
- Li X.* The FGF metabolic axis // *Front. Med.* 2019. V. 13. № 5. P. 511–530.
- Liang C.-M., Tai M.-C., Chang Y.-H. et al.* Glucosamine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of retinal pigment epithelium cells in culture and morphologic changes in a mouse model of proliferative vitreoretinopathy // *Acta Ophthalmol.* 2011. V. 89. № 6. P. e505–e514.

- Liu W., Jin G., Long C. *et al.* Blockage of Notch signaling inhibits the migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells // *Sci. World J.* 2013. V. 2013. P. 178708.
- Liu X., Yun F., Shi L. *et al.* Roles of signaling pathways in the epithelial-mesenchymal transition in cancer // *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2015. V. 16. № 15. P. 6201–6206.
- Liu Y., Cao G.F., Xue J. *et al.* Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-mediated *in vitro* human retinal pigment epithelial (RPE) cell migration mainly requires Akt/mTOR complex 1 (mTORC1), but not mTOR complex 2 (mTORC2) signaling // *Eur. J. Cell Biol.* 2012. V. 91. № 9. P. 728–737.
- Liu Y., Xin Y., Ye F. *et al.* Taz-tead1 links cell-cell contact to Zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 7. P. 3372–3378.
- Loda A., Turati M., Semeraro F. *et al.* Exploring the FGF/FGFR system in ocular tumors: new insights and perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 7.
- Lu W., Schneider M., Neumann S. *et al.* Nesprin interchain associations control nuclear size // *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 20. P. 3493–3509.
- Lueck K., Carr A.-J.F., Stampoulis D. *et al.* Regulation of retinal pigment epithelial cell phenotype by Annexin A8 // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4638.
- Lueck K., Carr A.-J.F., Yu L. *et al.* Annexin A8 regulates Wnt signaling to maintain the phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 1256.
- Luo G., Hofmann C., Bronckers A.L. *et al.* BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 22. P. 2808–2820.
- Luo M., Chen Y. Application of stem cell-derived retinal pigmented epithelium in retinal degenerative diseases: present and future // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 1. P. 150–159.
- Luo X., Gu S., Zhang Y., Zhang J. Kinsenoside ameliorates oxidative stress-induced RPE cell apoptosis and inhibits angiogenesis via Erk/p38/NF- κ B/VEGF signaling // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. № 240.
- Lutty G.A., Merges C., Threlkeld A.B. *et al.* Heterogeneity in localization of isoforms of TGF- β in human retina, vitreous, and choroid // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993. V. 34. № 3. P. 477–487.
- Markitantova Y.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N. FGF2 signaling pathway components in tissues of the posterior eye sector in the adult newt *Pleurodeles waltl* // *Biol. Bull.* 2014. V. 41. № 4. P. 297–305.
- Martínez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P. Eye development: A view from the retina pigmented epithelium // *BioEssays.* 2004. V. 26. № 7. P. 766–777.
- Martinez B., Peplow P. MicroRNAs as biomarkers of diabetic retinopathy and disease progression // *Neural Regen. Res.* 2019. V. 14. № 11. P. 1858.
- Mathura J.R., Jafari N., Chang J.T. *et al.* Bone morphogenetic proteins-2 and -4: negative growth regulators in adult retinal pigmented epithelium // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. V. 41. № 2. P. 592–600.
- Meng Y., Ren Z., Xu F. *et al.* Nicotinamide promotes cell survival and differentiation as kinase inhibitor in human pluripotent stem cells // *Stem Cell Reports.* 2018. V. 11. № 6. P. 1347–1356.
- Milyushina L.A., Kuznetsova A. V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A. Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. V. 151. № 4. P. 506–511.
- Mitsuhiro M.R.K., Eguchi S., Yamashita H. Regulation mechanisms of retinal pigment epithelial cell migration by the TGF- β superfamily // *Acta Ophthalmol. Scand.* 2003. V. 81. № 6. P. 630–638.
- Mitsuishi Y., Hasegawa H., Matsuo A. *et al.* Human CRB2 inhibits γ -secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 20. P. 14920–14931.
- Miyazono K., Shimanuki T. Bone morphogenetic protein receptors and actions // *Principles of Bone Biology.* Elsevier, 2008. P. 1177–1196.
- Moon C.H., Cho H., Kim Y.K., Park T.K. Nestin expression in the adult mouse retina with pharmaceutically induced retinal degeneration // *J. Korean Med. Sci.* 2017a. V. 32. № 2. P. 343–351.
- Moon K., Lee H.G., Baek W.K. *et al.* Bortezomib inhibits proliferation, migration, and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of RPE cells // *Mol. Vis.* 2017b. V. 23. P. 1029–1038.
- Müller F., Rohrer H., Vogel-Höpker A. Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo // *Development.* 2007. V. 134. № 19. P. 3483–3493.
- Nassar K., Grisanti S., Tura A. *et al.* A TGF- β receptor 1 inhibitor for prevention of proliferative vitreoretinopathy // *Exp. Eye Res.* 2014. V. 123. P. 72–86.
- Nguyen T., Mège R.M. N-Cadherin and fibroblast growth factor receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations // *Eur. J. Cell Biol.* 2016. V. 95. № 11. P. 415–426.
- Nieto M.A., Huang R.Y.Y.J., Jackson R.A.A., Thiery J.P.P. EMT: 2016 // *Cell.* 2016. V. 166. № 1. P. 21–45.
- Nishimoto S., Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2 // *EMBO Rep.* 2006. V. 7. № 8. P. 782–786.
- Nugent M.A., Iozzo R.V. Fibroblast growth factor-2 // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. № 2. P. 115–120.
- Nusse R., Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities // *Cell.* 2017. V. 169. № 6. P. 985–999.
- Opas M., Dziak E. bFGF-induced transdifferentiation of RPE to neuronal progenitors is regulated by the mechanical properties of the substratum // *Dev. Biol.* 1994. V. 161. № 2. P. 440–454.
- Ornitz D.M., Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway // *Wiley Interdiscip. Rev. Biol.* 2015. P. 215–266.
- Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K., Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // *Stem Cells.* 2008. V. 26. № 7. P. 1663–1672.
- Parapuram S.K., Chang B., Li L. *et al.* Differential effects of TGF β and vitreous on the transformation of retinal pigment epithelial cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. V. 50. № 12. P. 5965–5974.

- Pellissier L.P., Alves C.H., Quinn P.M. et al.* Targeted ablation of Crb1 and Crb2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 12. P. e1003976.
- Person F., Wilczak W., Hube-Magg C. et al.* Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers // *Tumor Biol.* 2017. V. 39. № 10. P. 1–11.
- Petrou P.A., Cunningham D., Shimel K. et al.* Intravitreal sirolimus for the treatment of geographic atrophy: results of a phase I/II clinical trial // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014. V. 56. № 1. P. 330–338.
- Pimiento J.M., Chen D.-T., Centeno B.A. et al.* Annexin A8 is a prognostic marker and potential therapeutic target for pancreatic cancer // *Pancreas.* 2015. V. 44. № 1. P. 122–127.
- Pittack C., Grunwald G.B., Reh T.A.* Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos // *Development.* 1997. V. 124. № 4. P. 805–816.
- Priglinger S.G., Alge C.S., Neubauer A.S. et al.* TGF- β 2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. № 3. P. 955–963.
- Qian X., Anzovino A., Kim S. et al.* N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties // *Oncogene.* 2014. V. 33. № 26. P. 3411–3421.
- Radeke M.J., Radeke C.M., Shih Y.-H. et al.* Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGF β pathway inhibitors: implications for age-related macular degeneration // *Genome Med.* 2015. V. 7. № 1. P. 58.
- Rajendran R., Sudha D., Chidambaram S. et al.* Retinoschisis and Norrie disease: a missing link // *BMC Res. Notes.* 2021. V. 14. № 1. P. 204.
- Rak D.J., Hardy K.M., Jaffe G.J., McKay B.S.* Ca⁺⁺-switch induction of RPE differentiation // *Exp. Eye Res.* 2006. V. 82. № 4. P. 648–656.
- Robertson I.B., Rifkin D.B.* Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. V. 8. № 6. P. a021907.
- Rodriguez J., Esteve P., Weinl C. et al.* SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 10. P. 1301–1309.
- Rosenthal R., Malek G., Salomon N. et al.* The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 337. № 1. P. 241–247.
- Roybal C.N., Velez G., Toral M.A. et al.* Personalized proteomics in proliferative vitreoretinopathy implicate hematopoietic cell recruitment and mTOR as a therapeutic target // *Am. J. Ophthalmol.* 2018. V. 186. P. 152–163.
- Saika S., Yamanaka O., Ikeda K. et al.* Inhibition of p38-MAP kinase suppresses fibrotic reaction of retinal pigment epithelial cells // *Lab. Invest.* 2005. V. 85. № 7. P. 838–850.
- Saini J.S., Corneo B., Miller J.D. et al.* Nicotinamide ameliorates disease phenotypes in a human iPSC model of age-related macular degeneration // *Cell Stem Cell.* 2017. V. 20. № 5. P. 635–647. e7.
- Sakai T., Kuno N., Takamatsu F. et al.* Prolonged protective effect of basic fibroblast growth factor-impregnated nanoparticles in Royal College of Surgeons rats // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 7. P. 3381–3387.
- Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 10. № 1. P. 88–95.
- Salmaninejad A., Pourali G., Shahini A. et al.* MicroRNA and exosome in retinal-related diseases: their roles in the pathogenesis and diagnosis // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2022. V. 25. № 2. P. 211–228.
- Samuel W., Jaworski C., Postnikova O.A. et al.* Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells // *Mol. Vis.* 2017. V. 23. P. 60–89.
- Sanford L.P., Ormsby I., Gittenberger-de Groot A.C. et al.* TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes // *Development.* 1997. V. 124. № 13. P. 2659–2670.
- Saxton R.A., Sabatini D.M.* mTOR signaling in growth, metabolism, and disease // *Cell.* 2017. V. 168. № 6. P. 960–976.
- Schaller M.D.* Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions // *J. Cell Sci.* 2010. V. 123. № 7. P. 1007–1013.
- Schouwey K., Aydin I.T., Radtke F., Beermann F.* RBP-J κ -dependent Notch signaling enhances retinal pigment epithelial cell proliferation in transgenic mice // *Oncogene.* 2011. V. 30. № 3. P. 313–322.
- Schouwey K., Beermann F.* The Notch pathway: hair graying and pigment cell homeostasis // *Histol. Histopathol.* 2008. V. 23. № 5. P. 609–619.
- Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G. et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
- Schwegler J.S., Knorz M.C., Akkoyun I., Liesenhoff H.* Basic, not acidic fibroblast growth factor stimulates proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells // *Mol. Vis.* 1997. V. 3. P. 1–10.
- Schweigerer L.* Basic fibroblast growth factor as a wound healing hormone // *Trends Pharmacol. Sci.* 1988. V. 9. № 12. P. 427–428.
- Senabouth A., Daniszewski M., Lidgerwood G.E. et al.* Transcriptomic and proteomic retinal pigment epithelium signatures of age-related macular degeneration // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 4233.
- Shahriari F., Satarian L., Moradi S. et al.* MicroRNA profiling reveals important functions of miR-125b and let-7a during human retinal pigment epithelial cell differentiation // *Exp. Eye Res.* 2020. V. 190. P. 107883.
- Sheridan C., Hiscott P., Grierson I.* Retinal pigment epithelium differentiation and dedifferentiation // *Essentials in Ophthalmology: Vitreo-Retinal Surgery* / Eds. Kirchhof B., Wong D. Springer, 2005. P. 101–119.
- Shu D.Y., Butcher E., Saint-Geniez M.* EMT and ENDMT: Emerging roles in age-related macular degeneration // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 12. P. 1–26.

- Siebel C., Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease // *Physiol. Rev.* 2017. V. 97. № 4. P. 1235–1294.
- Staal F.J.T. Wnt signalling meets epigenetics // *Stem Cell Investig.* 2016. V. 2016. № AUG. P. 38.
- Steindl-Kuscher K., Krugluger W., Boulton M.E. et al. Activation of the β -catenin signaling pathway and its impact on RPE cell cycle // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. V. 50. № 9. P. 4471–4476.
- Stapp M.A., Menko A.S. Immune responses to injury and their links to eye disease // *Transl. Res.* 2021. V. 236. P. 52–71.
- Sternfeld M.D., Robertson J.E., Shipley G.D. et al. Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor // *Curr. Eye Res.* 1989. V. 8. № 10. P. 1029–1037.
- Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 3. P. 845–881.
- Suyaya K., Shapiro I., Guttman M., Hazan R.B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor // *Cancer Cell.* 2002. V. 2. № 4. P. 301–314.
- Takahashi E., Nagano O., Ishimoto T. et al. Tumor necrosis factor- α regulates transforming growth factor- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 6. P. 4060–4073.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // *Cell.* 2009. V. 139. № 5. P. 871–890.
- Tien Y.T., Chang M.H., Chu P.Y. et al. Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells // *Vet. J.* 2015. V. 205. № 2. P. 244–253.
- Tosi G.M., Neri G., Caldi E. et al. TGF- β concentrations and activity are down-regulated in the aqueous humor of patients with neovascular age-related macular degeneration // *Sci. Rep.* 2018a. V. 8. № 1.
- Tosi G.M., Orlandini M., Galvagni F. The controversial role of TGF- β in neovascular age-related macular degeneration pathogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2018b. V. 19. № 11. P. 3363.
- Tuo J., Wang Y., Cheng R. et al. Wnt signaling in age-related macular degeneration: human macular tissue and mouse model // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. № 1. P. 330.
- Usui-Ouchi A., Ouchi Y., Kiyokawa M. et al. Upregulation of mir-21 levels in the vitreous humor is associated with development of proliferative vitreoretinal disease // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6.
- Valtorta F., Benfenati F., Greengard P. Structure and function of the synapsins // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 11. P. 7195–7198.
- Vinore S.A., Derevjani N.L., Mahlow J. et al. Class III β -tubulin in human retinal pigment epithelial cells in culture and in epiretinal membranes // *Exp. Eye Res.* 1995. V. 60. № 4. P. 385–400.
- Vinore S.A., Herman M.M., Hackett S.F., Campochiaro P.A. A morphological and immunohistochemical study of human retinal pigment epithelial cells, retinal glia, and fibroblasts grown on Gelfoam matrix in an organ culture system. A comparison of structural and nonstructural proteins and their application to cell // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1993. V. 231. № 5. P. 279–288.
- Walsh N., Valter K., Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina // *Exp. Eye Res.* 2001. V. 72. № 5. P. 495–501.
- Wang C., Cao G.F., Jiang Q., Yao J. TNF- α promotes human retinal pigment epithelial (RPE) cell migration by inducing matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression through activation of Akt/mTORC1 signaling // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 425. № 1. P. 33–38.
- Wang F.E., Zhang C., Maminishkis A. et al. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology // *FASEB J.* 2010. V. 24. № 5. P. 1552–1571.
- Warzecha C.C., Sato T.K., Nabet B. et al. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing // *Mol. Cell.* 2009. V. 33. № 5. P. 591–601.
- Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration // *Surv. Ophthalmol.* 1992. V. 36. № 5. P. 373–384.
- Wordinger R.J., Clark A.F. Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2007. V. 232. № 8. P. 979–992.
- Xie Y., Su N., Yang J. et al. FGF/FGFR signaling in health and disease // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020. V. 5. № 1.
- Xu J., Lamouille S., Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition // *Cell Res.* 2009. V. 19. № 2. P. 156–172.
- Xu J., Zhu D., He S. et al. Transcriptional regulation of bone morphogenetic protein 4 by tumor necrosis factor and its relationship with age-related macular degeneration // *FASEB J.* 2011. V. 25. № 7. P. 2221–2233.
- Xu Q., Wang Y., Dabdoub A. et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair // *Cell.* 2004. V. 116. № 6. P. 883–895.
- Xu W., Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. № 19. P. 3337–3344.
- Yafai Y., Iandiev I., Lange J. et al. Basic fibroblast growth factor contributes to a shift in the angioregulatory activity of retinal glial (müller) cells // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 7. P. e68773.
- Yang J., Shi P., Tu M. et al. Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity // *Food Sci. Hum. Wellness.* 2014. V. 3. № 3–4. P. 127–135.
- Yang L., Liu Z., Gong H. et al. Efficient delivery of NF- κ B siRNA to human retinal pigment epithelial cells with hyperbranched cationic polysaccharide derivative-based nanoparticles // *Int. J. Nanomedicine.* 2015a. V. 10. № 1. P. 2735.
- Yang S., Li H., Li M., Wang F. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Discov. Med.* 2015b. V. 20. № 110. P. 207–217.
- Yao H., Ge T., Zhang Y. et al. BMP7 antagonizes proliferative vitreoretinopathy through retinal pigment epithelial fibrosis *in vivo* and *in vitro* // *FASEB J.* 2019. V. 33. № 3. P. 3212–3224.

- Yao H., Li H., Yang S. et al.* Inhibitory effect of bone morphogenetic protein 4 in retinal pigment epithelial-mesenchymal transition // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 32182.
- Yasumuro H., Sakurai K., Toyama F. et al.* Implications of a multi-step trigger of retinal regeneration in the adult newt // *Biomedicines.* 2017. V. 5. № 2. P. 25.
- Yue J., López J.M.* Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. P. 2346.
- Zhang C., Su L., Huang L., Song Z.Y.* GSK3 β inhibits epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT pathways // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 7. P. 1120–1128.
- Zhao C., Wang Q., Temple S.* Stem cell therapies for retinal diseases: Recapitulating development to replace degenerated cells // *Dev.* 2017. V. 144. № 8. P. 1368–1381.
- Zhao C., Yasumura D., Li X. et al.* mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 1. P. 369–383.
- Zheng G., Lyons J.G., Tan T.K. et al.* Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor- β 1 in renal tubular epithelial cells // *Am. J. Pathol.* 2009. V. 175. № 2. P. 580–591.
- Zhou M., Geathers J.S., Grillo S.L. et al.* Role of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium dysfunction // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8.
- Zhu D., Deng X., Xu J., Hinton D.R.* What determines the switch between atrophic and neovascular forms of age related macular degeneration? - the role of BMP4 induced senescence // *Aging (Albany, NY).* 2009a. V. 1. № 8. P. 740–745.
- Zhu D., Wu J., Spee C. et al.* BMP4 mediates oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell senescence and is overexpressed in age-related macular degeneration // *J. Biol. Chem.* 2009b. V. 284. № 14. P. 9529–9539.
- Zhu J., Luz-Madrigal A., Haynes T. et al.* β -Catenin inactivation is a pre-requisite for chick retina regeneration // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e101748.
- Zhu J., Nguyen D., Ouyang H. et al.* Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF- β in ARPE-19 // *Int. J. Ophthalmol.* 2013. V. 6. № 1. P. 8–14.
- Zou H., Shan C., Ma L. et al.* Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy // *PeerJ.* 2020. V. 8. P. e10136.

Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Molecular Mechanism of Retinal Pigment Epithelial Cell Activation

A. V. Kuznetsova*

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

*e-mail: avkuzn@list.ru

Activated retinal pigment epithelial (RPE) cells are the main effector cells in the process of fibrosis, a major pathological feature in retinal diseases that including proliferative vitreoretinopathy. During rhegmatogenous retinal detachment, quiescent RPE cells change into an active fibroblast-like and myofibroblast-like phenotype which could create a favorable microenvironment for the development of fibrosis and facilitate its progression by increasing cell proliferation and their migration into the epiretinal space. The increased cell contractility ultimately results in a traction retinal detachment and loss of visual acuity. Many cellular signals are revealed contributing to the activation of RPE cells, such as transforming growth factor-beta, fibroblast growth factor-2, platelet derived growth factor, mitogen-activated protein kinase (MAPK), Smads, NF- κ B pathways and so on. Therefore, investigating the role of these factors and signaling pathways in RPE cells activation will promote the development of RPE cells-specific therapeutic strategies that may provide novel options for retinal therapy. In this review, we systematically summarize the current knowledge about RPE cells activation-associated stimulating factors and signaling pathways and hope to provide new strategies for the treatment of retinal diseases.

Keywords: retinal pigment epithelium, RPE, epithelial-mesenchymal transition, EMT, TGF- β /BMP signal pathway, FGF/FGFR signal pathway, WNT signal pathway, Notch signal pathway, vitreoretinal diseases

**СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ
В ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ
ПРИ РАЗВИТИИ *IN VIVO* И *IN VITRO***

© 2022 г. Т. Н. Игонина^а, Т. А. Рахманова^{а, б}, И. Н. Рожкова^а,
Е. Ю. Брусенцев^а, С. Я. Амстиславский^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, пр. ак. Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский государственный университет, ул. Пирогова, д. 2, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 18.07.2022 г.

Изучение роли липидов в преимплантационном развитии млекопитающих является важной задачей современной эмбриологии. Цель настоящего исследования – с использованием метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии охарактеризовать динамику содержания внутриклеточных липидов преимплантационных эмбрионов мыши при развитии *in vivo* и *in vitro*. Развитие преимплантационных эмбрионов сопровождалось снижением общего уровня липидов на стадии бластоцисты в группе *in vivo* и на стадии морулы в группе *in vitro*. Кроме того, при культивировании эмбрионов *in vitro* общее содержание липидов в морулах и бластоцистах было ниже, чем у эмбрионов тех же стадий, развивавшихся *in vivo*. Таким образом, липидный метаболизм в ходе преимплантационного периода зависит от условий развития (*in vivo* или *in vitro*). На стадии образования бластоцисты количество внутриклеточных липидов существенно снижается.

Ключевые слова: мышь, преимплантационные эмбрионы, внутриклеточные липиды, нильский красный, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, культивирование *in vitro*

DOI: 10.31857/S0475145022060039

ВВЕДЕНИЕ

Изучение роли внутриклеточных липидов в созревании ооцитов и в раннем преимплантационном развитии млекопитающих является важной фундаментальной проблемой современной эмбриологии (Arena et al., 2021; Igonina et al., 2021; Lawson et al., 2022). Липиды входят в состав внутриклеточных мембран и являются основным компонентом липидных гранул (ЛГ) (Ibayashi et al., 2021). Эти клеточные включения играют важную роль в хранении энергетического субстрата и поддержании целостности мембран клеток животных, а также влияют на клеточное ядро, участвуют в транспортировке жирных кислот (ЖК), экспрессии генов и защите от патогенов (Welte, 2015). Изучают влияние внутриклеточных липидов и на эффективность криоконсервации преимплантационных эмбрионов, в частности, эмбрионов мыши (Igonina et al., 2021).

На свинье была подробно изучена динамика изменения внутриклеточного содержания липидов в ходе созревания ооцитов и преимплантаци-

онного развития эмбрионов. В том числе было проведено сравнение уровня липидов в бластоцистах свиньи, развивавшихся *in vivo* и *in vitro* (Romek et al., 2011). Ооциты и преимплантационные эмбрионы свиньи чрезвычайно богаты липидами (Genicot et al., 2005; Romek et al., 2011). При этом их роль в ходе раннего развития свиньи достаточно хорошо изучена (Bradley, Swann, 2019). Мышь относится к видам с низким содержанием липидов в ооцитах и клетках преимплантационных эмбрионов (Genicot et al., 2005). Роль внутриклеточных липидов в раннем развитии мыши не столь очевидна и является предметом изучения для нескольких исследовательских групп (Watanabe et al., 2010; Bradley et al., 2016; Tatsumi et al., 2018; Aizawa et al., 2019; Брусенцев и др., 2020; Ibayashi et al., 2021; Arena et al., 2021).

Следует отметить, что лишь в двух работах произведена попытка изучить число и размер липидных гранул в ходе созревания ооцитов и раннего развития эмбрионов мыши (Watanabe et al., 2010; Bradley et al., 2016). Между тем, общее содер-

жание внутриклеточных липидов в ходе преимплантационного развития мыши до сих пор не изучено. В нашем предыдущем исследовании было проанализировано содержание внутриклеточных липидов при созревании ооцитов мыши (Брусенцев и др., 2020). Цель настоящего исследования – с использованием метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии охарактеризовать динамику содержания внутриклеточных липидов преимплантационных эмбрионов мыши при развитии *in vivo* и *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте было использовано 58 половозрелых самок и 11 самцов мышей линии CD1 в возрасте от двух до трех месяцев. Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiRAT (Animal Care, США) при температуре 22–24°C и влажности 40–50%; в качестве подстилки использовали опилки. Суточный цикл состоял из 12 ч дня и 12 ч ночи, с восходом в 4 ч утра и закатом в 16 ч. Животные имели постоянный доступ к автоклавированному стандартизированному корму “Sniff” (Soest, Германия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками “Северянка” (Экопроект, Россия).

Были сформированы следующие группы: 1) преимплантационные эмбрионы, развивающиеся в условиях *in vivo*, полученные от самок-доноров на стадиях 2-клеток ($n = 35$), 4-клеток ($n = 23$), 8-клеток ($n = 15$), морулы ($n = 25$) и бластоцисты ($n = 36$); 2) преимплантационные эмбрионы, развивающиеся в условиях *in vitro*, полученные от самок-доноров на стадиях 2-клеток и культивированные *in vitro* до 4-клеток ($n = 29$), 8-клеток ($n = 15$), морулы ($n = 32$) и бластоцисты ($n = 40$). В группу “бластоцисты” входили эмбрионы с полностью сформированной полостью.

У самок мышей CD1 индуцировали суперовуляцию путем инъекции 5 МЕ хорионического гонадотропина лошади (Фоллигон; Intervet international, B.V., Нидерланды) а затем, через 46 часов, 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (Хорулон; Intervet international, B.V., Нидерланды). После чего, самок ссаживали на ночь с фертильными самцами этой же линии. Спаривание проверяли по наличию вагинальной пробки. Для получения преимплантационных эмбрионов на разных стадиях развития *in vivo* самок подвергали эктаназии путем дислокации шейных позвонков через 24 ч после введения ХГЧ (2-клеточные), 36 ч (4-клеточные), 48 ч (8-клеточные), 72 ч (морулы) и 84 ч (бластоцисты). Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой Flushing Solution (FertiPro, Бельгия).

Для экспериментов *in vitro* 2-клеточные эмбрионы получали описанным выше способом. Затем проводили их культивирование *in vitro* на 35 мм чашках Петри (Corning, США). Группы из 3–5 эмбрионов находились в 20 мкл каплях KSOM под минеральным маслом (Merck, Германия) при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия). Эмбрионы культивировали в течение 12 ч (до стадии 4-х клеток), 24 ч (до стадии 8-ми клеток), 48 ч (до стадии морулы) и 72 ч (до стадии бластоцисты) Эмбриональное развитие контролировали визуально под микроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия).

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

Данные анализировали с помощью программы STATISTICA v 8.0 StatSoft, Inc. Проверка распределения на нормальность проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для обсчета данных использовали многофакторный дисперсионный анализ (Factorial ANOVA) с последующим апостериорным сравнением (Fisher LSD). Интенсивность флуоресценции липидов (число фотонов) представлена, как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Различия при $p < 0.05$ считали статистически достоверными.

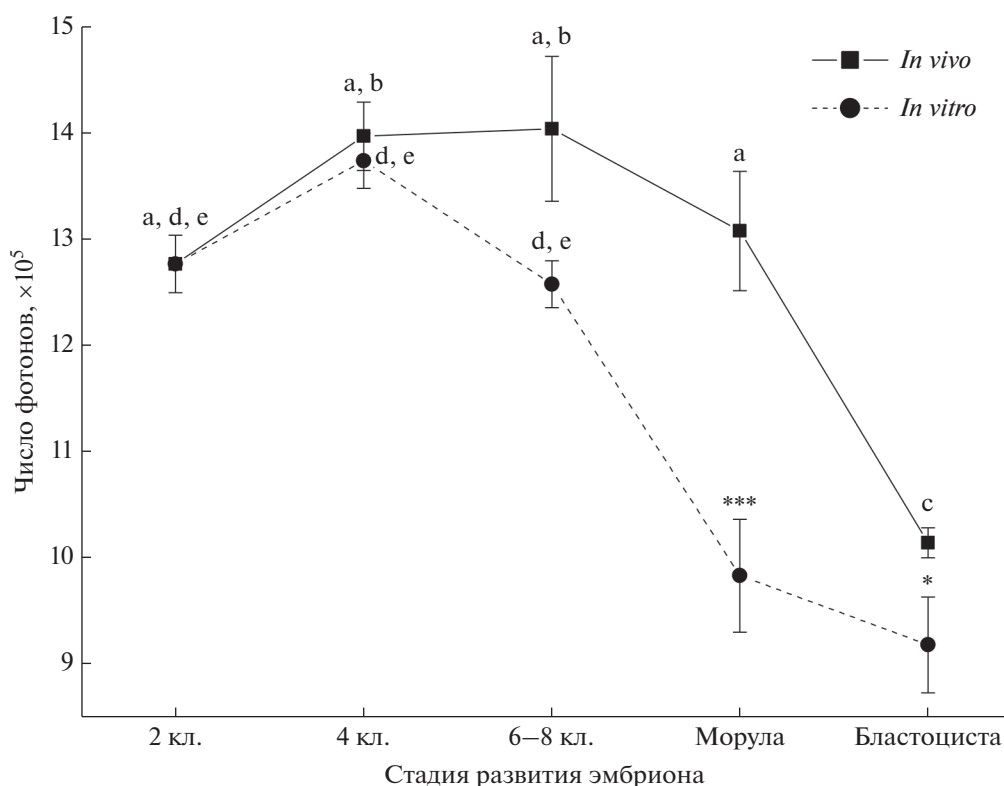


Рис. 1. Динамика содержания липидов в преимплантационных эмбрионах мыши. ^a $p < 0.001$ по сравнению с бластоцистами *in vivo*; ^b $p < 0.05$ по сравнению с двухклеточными эмбрионами *in vivo*; ^c $p < 0.001$ по сравнению с двухклеточными эмбрионами *in vitro*; ^d $p < 0.001$ по сравнению с морулами *in vitro*; ^e $p < 0.001$ по сравнению с бластоцистами *in vitro*; * $p < 0.05$ по сравнению с бластоцистами *in vivo*; *** $p < 0.001$ по сравнению с морулами *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по интенсивности флуоресценции (числу фотонов, чф), полученные при изучении преимплантационных эмбрионов разных стадий, развивавшихся *in vivo* и *in vitro*, представлены на рис. 1. Репрезентативные иллюстрации по каждой стадии развития представлены на рис. 2. Анализ данных с помощью Factorial ANOVA показал статистически значимое влияние на число фотонов таких факторов, как “условия развития эмбрионов” (*in vivo* или *in vitro*) ($F_{1,275} = 20.36, p = 0.00001$) и “стадия развития эмбриона” ($F_{4,275} = 40.20, p = 0.0000$), а также взаимодействие этих факторов ($F_{4,275} = 5.57, p = 0.00025$).

Развитие преимплантационных эмбрионов сопровождалось снижением содержания липидов, которое наблюдали на стадии бластоцисты в группе *in vivo* и на стадии морулы в группе *in vitro*. Анализ *post-hoc* при помощи Fisher LSD теста показал большее содержание липидов ($p < 0.001$) в развивающихся *in vivo* эмбрионах на стадиях 2 кл. (чф $12.8 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$), 4 кл. (чф $14.0 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$), 6–8 кл. (чф $14.0 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$) и морулы (чф $13.1 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$) по сравнению с бластоцистами (чф $10.1 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$). Более того,

развивающиеся *in vivo* эмбрионы на стадии 4 кл. (чф $14.0 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$) и 6–8 кл. (чф $14.0 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$) имели большее содержание липидов по сравнению с двухклеточной стадией (чф $12.8 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$) ($p < 0.05$). В то же время, развивающиеся *in vitro* эмбрионы имели большее содержание липидов ($p < 0.001$) на стадиях 2 кл. (чф $12.8 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$), 4 кл. (чф $13.7 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$) и 6–8 кл. (чф $12.6 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$) по сравнению с морулами (чф $9.8 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$) и бластоцистами (чф $9.2 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$).

Кроме того, при культивировании эмбрионов *in vitro*, общее содержание липидов в морулах ($p < 0.001$) и бластоцистах ($p < 0.05$) было ниже, чем у эмбрионов тех же стадий, развивавшихся *in vivo* (чф $9.8 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$ и $13.1 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$; чф $9.2 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$ и $10.1 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что у эмбрионов мыши на стадиях дробления внутриклеточные липиды не играют существенной роли как энергетический субстрат (Bradley, Swann, 2019). Поэтому мы ожидали, что в

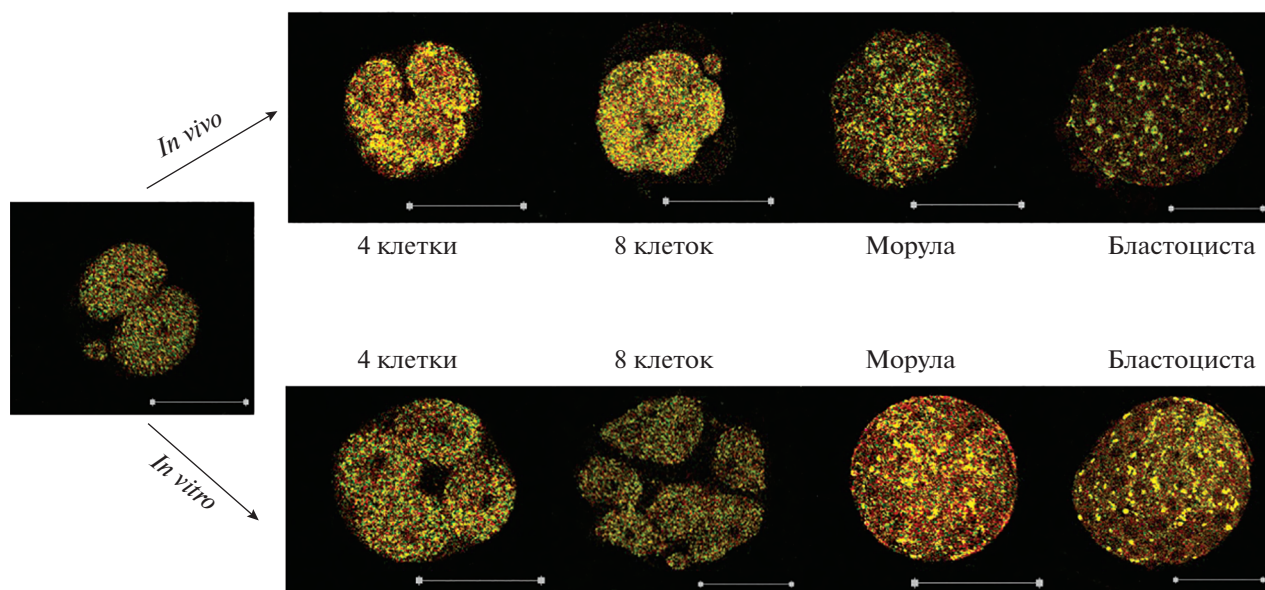


Рис. 2. Содержание внутриклеточных липидов в эмбрионах мыши, развивающихся *in vivo* и *in vitro*. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Окрашивание нильским красным. Масштабный отрезок – 100 мкм.

ходе дробления их содержание в клетках эмбриона снижаться не будет. Однако в нашем исследовании было обнаружено, что у эмбрионов, полученных *in vivo*, содержание внутриклеточных липидов на стадиях 4-х и 8-и бластомеров повышается по сравнению со стадией 2-х бластомеров. Такого повышения не наблюдалось при развитии эмбрионов *in vitro*. Данная закономерность, наблюдаемая *in vivo*, может быть связана с развитием эмбрионов в естественной жидкости яйцевода. Эта жидкость состоит из множества компонентов, в том числе жирных кислот, которые проникают в клетки и используются для синтеза и накопления новых жиров (Ibayashi et al., 2021). С другой стороны, синтетическая питательная среда KSOM, которую мы использовали для культивирования эмбрионов, не содержит жирных кислот, а их переносчик, бычий сывороточный альбумин (БСА), присутствует в ней в низкой 1%-ной концентрации (Lawitts, Biggers, 1993). Именно этим, по всей вероятности, можно объяснить тот факт, что количество внутриклеточных липидов не повышается на стадиях дробления при развитии зародышей *in vitro*. На эмбрионах крупного рогатого скота были изучены последствия добавления в культуральную среду фетальной телячьей сыворотки (многокомпонентной смеси с варьирующим составом). У культивировавшихся в этой среде эмбрионов уровень внутриклеточных липидов (особенно на стадиях морулы и бластоцисты) был выше, чем у эмбрионов, развивавшихся *in vivo* (Abe et al., 1999). В нашей предыдущей работе было продемонстрировано, что у эмбрионов мышей, развивающихся *in vitro*, происходит по-

вышение общего содержания внутриклеточных липидов при добавлении жирных кислот в питательную среду (Igonina et al., 2021).

В настоящей работе было показано уменьшение количества внутриклеточных липидов в ходе развития эмбрионов мышей до стадии бластоцисты как *in vivo*, так и *in vitro*. Это предположительно связано с тем, что при переходе от стадии морулы к бластоцисте может происходить переключение метаболизма с углеводного на жировой (Ibayashi et al., 2021). При этом происходит образование агрегатов из липидных гранул, а энергетический субстрат начинает активно утилизироваться благодаря повышенному липолизу (в частности, перед имплантацией) (Watanabe et al., 2010; Romek et al., 2011; Bradley et al., 2016). Ранее были выполнены исследования на эмбрионах мыши, культивировавшихся *in vitro* на среде KSOM или KSOM-AA (обогащенной аминокислотами). У таких эмбрионов со стадии 2-х бластомеров до морулы или бластоцисты происходит уменьшение числа липидных гранул за счет их агрегации, но каким образом изменяется общее количество внутриклеточных липидов до сих пор не исследовано (Watanabe et al., 2010; Bradley et al., 2016). Подобное снижение количества внутриклеточных липидов было показано в экспериментах на эмбрионах свиньи при их культивировании *in vitro* до стадии бластоцисты (Romek et al., 2011). Уменьшение объема липидных гранул, как правило, происходит за счет липолиза триацилглицеридов липазами, расположенными на поверхности их мембран. При этом жирные кислоты высвобождаются для митохондриального метаболизма (Lawson

et al., 2022). Более того, в ходе преимплантационного развития может происходить селективная аутофагия липидных гранул липосомами (липофагия), что также снижает со временем количество внутриклеточных липидов (Tsukamoto et al., 2008). Таким образом, липидный метаболизм в ходе преимплантационного развития мыши зависит от тех условий, в которых оно происходит, а именно — *in vivo* или *in vitro*. Между тем, независимо от условий, в которых происходит развитие эмбрионов мышей, на стадии формирования blastocysts количество внутриклеточных липидов существенно снижается по сравнению с предыдущими стадиями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность инженерам ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” (<http://spf.bionet.nsc.ru>) и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-74-10108. Содержание животных осуществляли благодаря бюджетному проекту № FWNR-2022-0023 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

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.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы С.Я. Амстиславский, Т.А. Рахманова, Т.Н. Игонина, Е.Ю. Брусенцев разработали дизайн эксперимента. Авторы Т.А. Рахманова, И.Н. Рожкова и Т.Н. Игонина получали преимплантационные эмбрионы мышей и проводили их культивирование *in vitro*. Автор Т.А. Рахманова проводила окрашивание эмбрионов нильским красным с последующей конфокаль-

ной микроскопией для оценки общего количества липидов. Авторы С.Я. Амстиславский, Е.Ю. Брусенцев, Т.А. Рахманова и Т.Н. Игонина участвовали в обработке данных. Авторы С.Я. Амстиславский, Т.А. Рахманова и Е.Ю. Брусенцев участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брусенцев Е.Ю., Чуйко Э.А., Окотруб К.А., 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.
- Abe H., Yamashita S., Itoh T., Satoh T., Hoshi H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium // Mol. Reprod. Dev. 1999. V. 53. P. 325–335.
- Aizawa R., Ibayashi M., Tatsumi T., Yamamoto A., Kokubo T., Miyasaka N., Sato K., Ikeda S., Minami N., Tsukamoto S. Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development // Development. 2019. V. 146. dev181925.
- Arena R., Bisogno S., Gasior L. et al. Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. e2018362118.
- Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos // Int. J. Dev. Biol. 2019. V. 63. P. 93–103.
- Bradley J., Pope I., Masia F., Sanusi R., Langbein W., Swann K., Borri P. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy // Development. 2016. V. 143. P. 2238–2247.
- Genicot G., Leroy J.L., Soom A.V., Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // Theriogenology. 2005. V. 63. P. 1181–1194.
- Ibayashi M., Aizawa R., Mitsui J., Tsukamoto S. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos // Reproduction. 2021. V. 162. R99–R109.
- Igonina T.N., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Chuyko E.A., Ragaeva D.S., Ranneva S.V., Amstislavsky S.Y. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after *in vitro* culture with linoleic acid // Cryobiology. 2021. V. 99. P. 55–63.
- Lawitts J.A., Biggers J.D. Culture of preimplantation embryos // Methods. Enzymol. 1993. V. 225. P. 153–164.
- Lawson E.F., Grupen C.G., Baker M.A., Aitken R.J., Swegen A., Pollard C.L., Gibb Z. Conception and early pregnancy in the mare: lipidomics the unexplored frontier // Reprod. Fertil. 2022. V. 3. R1–R18.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implan-

- tation embryos using Nile Red fluorescent probe // *Theriogenology*. 2011. V. 75. P. 42–54.
- Tatsumi T., Takayama K., Ishii S., Yamamoto A., Hara T., Minami N., Miyasaka N., Kubota T., Matsuura A., Itakura E., Tsukamoto S. Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse // *Development*. 2018. V. 145. dev161893.
- Tsukamoto S., Kuma A., Murakami M., Kishi C., Yamamoto A., Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos // *Science*. 2008. V. 321. P. 117–120.
- Watanabe T., Thayil A., Jesacher A., Grieve K., Debarre D., Wilson T., Booth M., Srinivas S. Characterisation of the dynamic behaviour of lipid droplets in the early mouse embryo using adaptive harmonic generation microscopy // *BMC Cell Biol*. 2010. V. 11. P. 38.
- Welte M.A. Expanding roles for lipid droplets // *Curr. Biol*. 2015. V. 25. R470–R481.

Intracellular Lipids during *in vivo* and *in vitro* Preimplantation Embryo Development in Mice

T. N. Igonina¹, T. A. Rakhmanova^{1, 2}, I. N. Rozhkova¹,
E. Yu. Brusentsev¹, and S. Ya. Amstislavsky^{1, *}

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

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

*e-mail: amstis@yandex.ru

Investigation the role of lipids in mammalian preimplantation development is a hot edge of the modern embryology. The aim of this study was to evaluate the amount of intracellular lipids in preimplantation mouse embryos during *in vivo* and *in vitro* development using confocal laser scanning microscopy. The development of preimplantation embryos was accompanied by a decrease in total lipid content, which was observed *in vivo* at the blastocyst stage and at morula stage *in vitro*. Besides, during *in vitro* embryo development total lipid content was lower as compared to *in vivo* development. Thus, lipid metabolism during the preimplantation period depends on the conditions in which development occurs (*in vivo* or *in vitro*); at blastocyst stage, the amount of intracellular lipids in preimplantation mouse embryos significantly decreases.

Keywords: mice, preimplantation embryo, intracellular lipids, Nile Red, confocal laser scanning microscopy, *in vitro* culture

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОВЫШЕНИЕ И ПониЖЕНИЕ УРОВНЯ СЕРОТОНИНА МАТЕРИ ИЗМЕНЯЕТ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТРАЕКТОРИИ ПОТОМКОВ У РЫБ С ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ ДИАПАУЗАМИ

© 2022 г. В. Б. Борисов^{а, *}, Ф. Н. Шкиль^{а, б}

^аИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

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

*e-mail: v.borisov.sev@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2022 г.

После доработки 09.08.2022 г.

Принята к публикации 21.08.2022 г.

Карпозубые рыбы “killifish” (Cyprinodontiformes; Teleostei), населяющие эфемерные водоемы, характеризуются высокой степенью онтогенетической пластичности – способностью к адаптивным изменениям онтогенетической траектории в ответ на изменение внешних условий. Изменение онтогенетических траекторий происходит за счет эмбриональных диапауз, которые позволяют переживать неблагоприятные условия. В настоящей работе мы экспериментально протестировали отложенные эффекты фармакологического повышения (НТР группа) и понижения (РСРА группа) уровня серотонина в организме матери на ход онтогенеза потомства у афиосемиона Гарднера (*Fundulopanchax gardneri*). Контрольная группа продемонстрировала типичную для killifish высокую онтогенетическую и фенотипическую изменчивость. Выклев личинок был растянут во времени, но характеризовался ярко выраженным пиком. Вылупляющиеся личинки имели разную степень редукции желточного мешка и развития скелета. У эмбрионов, полученных от самок с искусственно измененным уровнем серотонина, наблюдались гетерохронии, т.е. изменения сроков и темпов онтогенеза, а также снижение онтогенетической и фенотипической изменчивости. Так, в НТР группе наблюдалось замедление раннего развития, но ускорение и синхронизация более поздних стадий эмбриогенеза. В результате, выклев носил массовый характер, а личинки были более развиты, чем в контрольной группе. В РСРА группе, несмотря на некоторое сокращение временного интервала выклева, произошло перераспределение частот рано и поздно выходящих из икры личинок, что привело к исчезновению пика выклева. Полученные данные указывают на то, что серотонин выступает в качестве эпигенетического сигнала, модулирующего ход онтогенеза потомства и имеющего высокий адаптационный потенциал.

Ключевые слова: гетерохронии, онтогенетическая пластичность, killifish, *Fundulopanchax gardneri*

DOI: 10.31857/S0475145022060027

ВВЕДЕНИЕ

Повышенный интерес биологов развития и эволюционных биологов к нетаксономической группе “killifish”, объединяющей более 1200 видов пресноводных икромечущих рыб отряда карпозубообразные (Cyprinodontiformes; Teleostei), обусловлен рядом факторов. Среди них ведущую роль играют: большое разнообразие фенотипов и жизненных циклов (Furness, 2015; Valenzano et al., 2015; Verois et al., 2017; Hu, Brunet, 2018; Willemsen et al., 2020); способность в короткие сроки приспособляться к новым, зачастую экстремальным внешним условиям (Whitehead et al., 2011; Wagner, Podrabsky, 2015; Eide et al., 2021); относи-

тельно небольшие размеры геномов, что позволяет широко применять современные методы молекулярно-генетического анализа (Reid et al., 2017; Romney, Podrabsky, 2017; Poeschla, Valenzano, 2020; Chalar et al., 2021; Astre et al., 2022; Di Genova et al., 2022); и простота содержания в лабораторных условиях. Особенный интерес представляет высокая степень онтогенетической пластичности killifish, многие виды которых способны к адаптивным изменениям онтогенетической траектории за счет эмбриональных диапауз – задержек или остановок развития зародыша, в ответ на изменение внешних факторов (Podrabsky et al., 2010a; Furness, 2015; Dominguez-Castanedo et al., 2017; Naumann, Englert, 2018).

Аннуальные виды killifish (annual killifishes) обладают коротким (менее одного года) жизненным циклом, характеризующимся интенсивными процессами роста, полового созревания и размножения в течение короткого благоприятного периода, и эмбрионами, способными выживать в крайне неблагоприятных сезонных условиях. Широко распространенные среди killifish эмбриональные диапаузы позволяют переживать засуху и критическое снижение концентрации растворенного в воде кислорода (Anderson, Podrabsky, 2014). Диапаузы могут быть факультативными или облигатными и происходить на разных стадиях эмбрионального развития: ранней гаструлы (DI), позднего сомитогенеза (DII) и полностью сформированного эмбриона (DIII) (Wourms, 1972a). DI характеризуется снижением или остановкой митотической активности клеток эмбриона (Romney, Podrabsky, 2017; Naumann, Englert, 2018; Dolfi et al., 2019). DII сопровождается максимальным замедлением метаболических процессов и отличается большой продолжительностью. Это позволяет эмбрионам переносить неблагоприятный период засухи, находясь в грунте под защитой яйцевых оболочек (Podrabsky et al., 2010b; Anderson, Podrabsky, 2014). DIII характеризуется снижением метаболизма у готового к выклеву эмбриона, что дает возможность выйти из яйца в момент наступления благоприятных условий (Martin, Podrabsky, 2017; Chalar et al., 2021).

Внутренние факторы, ответственные за наступление диапауз и реализацию той или иной онтогенетической траектории у killifish, активно изучаются (Karp, 2021; Singh et al., 2021). Считается, что вероятность DI определяется составом переданных от матери регуляторных РНК, влияющих на активность сигнальных каскадов клеток эмбриона (Romney, Podrabsky, 2017). Причины и механизмы впадения эмбриона в состояние DII и DIII остаются малоизученными. Предполагается, что вероятность наступления и сроки этих диапауз определяются активностью эндокринной системы эмбриона, изменяющейся в ответ на колебания температуры и содержания кислорода во внешней среде (Romney et al., 2018; Karp, 2021). Экспериментальными методами было показано, что ингибирование экспрессии инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) у эмбрионов модельных аннуальных killifish инициирует DII, в то время как увеличение уровня IGF-I стимулирует прямое развитие, без диапауз (Woll, Podrabsky, 2017). Однако, большинство исследователей сходятся во мнении, что IGF-I далеко не единственный фактор, играющий роль в выборе той или иной траектории развития killifish (Karp, 2021), и необходимо проведение дальнейших исследований с привлечением новых, немодельных объектов (Singh et al., 2021).

Одним из вероятных кандидатов на роль сигнального фактора, участвующего в регуляции онтогенетической пластичности killifish, является серотонин. Данный моноамин сочетает функции межклеточного мессенджера и гормона с плейотропным эффектом. Серотонин оказывает существенное влияние на онтогенез многоклеточных (Turlejski, 1996; Buznikov et al., 2001), однако, его роль в развитии рыб изучена слабо. Известно, что серотонин (по всей видимости, материнский) присутствует уже на самых ранних этапах развития рыб, в ранних бластомерах и неклеточных структурах (Côté et al., 2007; Ivashkin et al., 2019; Romero-Reyes et al., 2021), но его онтогенетическая роль остается неясной. На более поздних этапах онтогенеза серотонин может выступать в качестве морфогена (Nardi et al., 2017) и участвовать в регуляции развития центральной нервной системы (Airhart et al., 2012; Barreiro-Iglesias et al., 2015). Кроме того, серотонинергическая система задействована в регуляции синтезирующей активности различных эндокринных клеток (Cano-sa et al., 2007; Lillesaar, 2011; Prasad et al., 2015; McDonald, 2017; Thompson, Vijayan, 2022). Показано, что у рыб высокий уровень серотонина стимулирует продукцию гонадотропина, но подавляет синтез соматотропного гормона (Wong et al., 1998; Prasad et al., 2015). У млекопитающих отмечены сходные эффекты: внутриутробная гиперсеротонемия подавляет синтез соматотропного гормона, дефицит которого, в свою очередь, приводит к снижению активности синтеза IGF-I (Musumeci et al., 2013), сигнала, ответственного за наступление диапауз у killifish (Karp, 2021). Учитывая, что у рыб экспрессия IGF-I также напрямую регулируется соматотропным гормоном (Triantaphyllopoulos et al., 2020), можно предположить, что изменения уровня серотонина будут иметь сходный эффект, но данные о взаимоотношениях этих сигнальных систем носят спорадический характер (Jonsson, Bjornsson, 2002).

В организме матери активность синтеза серотонина зависит от множества внешних и внутренних факторов, имеющих четкую сезонную динамику в эфемерных сообществах, в том числе от внешних температур, состава и обилия пищи, социальной активности и возраста (Winberg et al., 1991; Prasad et al., 2015; Winberg, Thornqvist, 2016; Nonnis et al., 2021; Evsukova et al., 2021; Uyttebroeck et al., 2022). С учетом этого, можно предположить, что материнский серотонин выступает в роли эпигенетического сигнала, определяющего наиболее адекватную в текущих условиях онтогенетическую траекторию потомков, как это было показано для других животных (Ivashkin et al., 2015; Andreatta et al., 2018; Voronezhskaya et al., 2022).

В настоящей работе мы экспериментально оценили, как фармакологическое повышение и понижение уровня серотонина в организме матери влияют на эмбриональное развитие афиосемиона Гарднера, *Fundulopanchax gardneri* (Boulenger, 1911) – западноафриканского представителя killifish, тип онтогенеза которого считается анцестральным для современных высокоспециализированных аннуальных видов (Peters, 1963).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлась лабораторная линия стального афиосемиона *Fundulopanchax (=Aphyosemion) gardneri* нигерийского происхождения. Этот представитель семейства нотобранхиевых (Nothobranchiidae) не относится к аннуальным видам и преимущественно населяет постоянные водоемы (Peters, 1963).

Изменение уровня серотонина у близкородственных десятидневных самок достигалось традиционными методами (Airhart et al., 2012; Maximino et al., 2013; Ivashkin et al., 2019; Faria et al., 2021). Были созданы три экспериментальные группы, состоящие из трех-четырех самок: 1) контроль – группа, содержащаяся в чистой воде; 2) НТР группа – группа, содержащаяся в воде с добавлением 10 мг/л 5–гидрокситриптофана (НТР) – непосредственного биохимического предшественника серотонина; 3) РСРА группа, содержащаяся в воде с добавлением 1 мг/л паралорфенилаланина (РСРА) – ингибитора триптофангидроксилазы, фермента ответственного за гидроксирование НТР (рис. 1). Фармакологическая обработка самок продолжалась в течение 14 дней. Таким образом, предполагалось, что уровень серотонина будет повышен в тканях особей НТР группы и понижен в тканях особей РСРА группы. Учитывая продолжительность обработки, мы использовали 1/10 концентрации НТР и 1/20 РСРА, от концентраций, ранее использованных для краткосрочного воздействия на рыб (Airhart et al., 2012; Maximino et al., 2013; Ivashkin et al., 2019; Faria et al., 2021). Непосредственно перед скрещиванием самки каждой группы переводились в чистую воду. Полученная в результате естественного скрещивания оплодотворенная икра обрабатывалась метиленовым синим и раскладывалась поштучно в лунки иммунологического планшета для проведения индивидуальных наблюдений и минимизации взаимного влияния. Инкубация икры проводилась в условиях, считающихся оптимальными для данного вида (<https://www.seriouslyfish.com/species/fundulopanchax-gardneri-gardneri/>): при постоянной температуре (22°C), естественном освещении, под слоем по-

стоянно аэрируемой воды 1–2 сантиметра. Эксперимент был повторен дважды.

На 6 и 10 день после оплодотворения (дпо) оценивались длина (L) и ширина (W) головы, частота сердцебиения, число сомитов и общее морфологическое состояние эмбрионов. На основе этих данных делались выводы о наличии или отсутствии диапаузы (DII). Состояние диапаузы (DIII) определялось по продолжительной задержке выклева полностью сформированных эмбрионов одновременно с существенным уменьшением частоты сердечных сокращений и подвижности тела.

В момент выклева осуществлялось измерение стандартной длины (SL) личинок и их фиксация в 4% PFA. Небольшая часть личинок прижизненно окрашивалась флуоресцентным кальцеином (Calcein Am, Sigma) по методике Du et al. (2001). Изготовление тотальных препаратов скелета эмбрионов и личинок велось по методике Walker, Kimmel (2007). Изучение препаратов проводилось с помощью методов световой (стереомикроскопы Olympus SZx9 и Leica EZ4) и конфокальной (Zeiss LSM 800) микроскопии на базе Центра коллективного пользования ИБР РАН. Для каждого образца было подсчитано: число костей черепа, позвонков и лучей хвостового плавника (лепидотрихий). Критерием наличия окостенения являлась окраска костной ткани ализарином, видимая при помощи светового микроскопа. Конфокальная микроскопия использовалась для верификации результатов, полученных при помощи световой микроскопии, и получения иллюстративного материала. Таким образом, нами были изучены рост и развитие эмбрионов, динамика выхода личинок из яйца, размеры тела и состояние костного скелета в момент выклева в экспериментальных группах *F. gardneri*. Учитывались только эмбрионы, покинувшие яйцевые оболочки в виде жизнеспособных личинок. Всего изучено 148 эмбрионов в контрольной группе, 51 в группе “НТР” и 30 в группе “РСРА”.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ Statistica 6.0. Определение статистически значимых различий частоты сердечных сокращений и размеров ранних эмбрионов производилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Взаимная зависимость пяти исследуемых характеристик в момент выклева (число костей черепа, позвонков и лучей хвостового плавника, SL и возраст) анализировалась с помощью ранговой корреляции Спирмена. Парное сравнение временной динамики выклева в различных экспериментальных группах производилось с использованием непараметрического критерия U Манна–Уитни, коэффициентов асимметрии и эксцесса распределения. Сравнение зависимости SL и степени развития

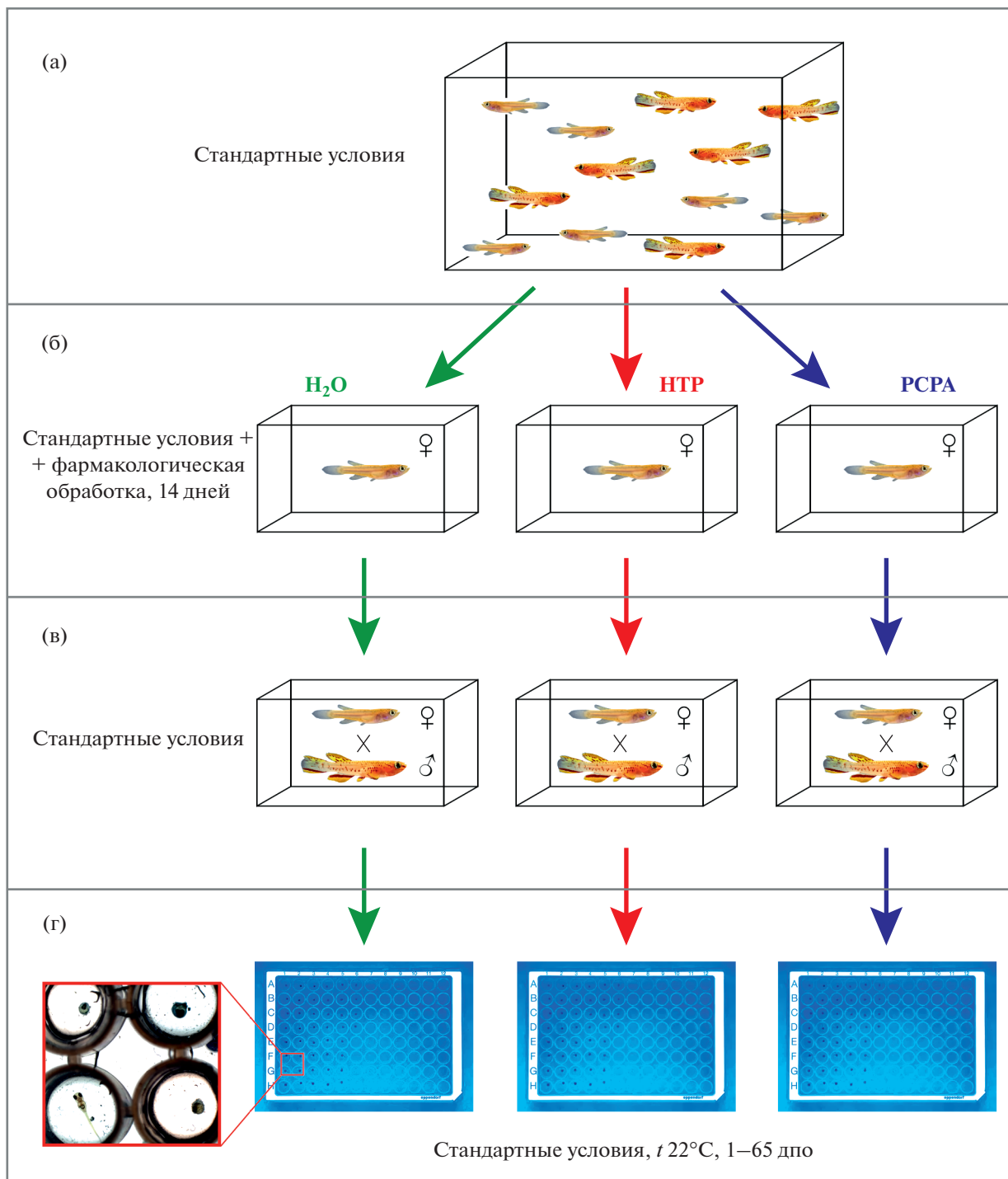


Рис. 1. Схема эксперимента по изменению уровня серотонина у самок *F. gardneri* и выращиванию их потомства в стандартных условиях. (а) Маточное стадо *F. gardneri*; (б) фармакологическая обработка самок в течение 14 дней (Н₂О – контрольная группа, НТР – группа, обработанная биохимическим предшественником серотонина; РСРА – группа, обработанная ингибитором триптофангидроксилазы); (в) скрещивание экспериментальных самок с самцами в чистой воде; (г) инкубация икры в иммунологических планшетах при стандартных условиях, t = 22°C.

скелета от возраста личинок проводилось с помощью построения линейных регрессионных моделей. Для выполнения попарных сравнений групповых средних (для 4х признаков: SL, число ко-

стей черепа, позвонков и лучей хвостового плавника в момент вылупления) нами был использован критерий достоверно значимой разности Тьюки (Tukey's HSD test) для неравных выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост и развитие эмбрионов в контрольной группе

Эмбриогенез *F. gardneri* при 22°C характеризуется высокой пластичностью, вследствие чего могут быть описаны, по меньшей мере, четыре онтогенетических траектории. Первая из них — “быстрая” траектория характеризуется прямым развитием, происходящим без остановок роста и морфологической дифференциации эмбриона. Три “медленные” траектории характеризуются прохождением одной (DII или DIII) или обеих эмбриональных диапауз.

При прямом развитии к 3-му дпо формируется нейрула, а к 5-му дпо становятся хорошо различимыми хорда, глаза и отделы головного мозга, Купферов пузырек и несколько пар сомитов (не более 10). К этому времени эмбрионы характеризуются значительной синхронностью развития и сходством размеров головы (средние значения $W \sim 0.2$ мм, а $L \sim 0.4$ мм).

При увеличении количества сомитов от 10-ти до 15-ти пар происходит развитие органов чувств, исчезает Купферов пузырек, появляется нефункционирующее сердце.

При увеличении количества сомитов от 15-ти до 25-ти пар наблюдается активное развитие пигментной системы: тело эмбриона и желточный мешок покрываются меланофорами, меланин начинает откладываться и в глазах. Начинаются сокращения сердца зародыша, становятся различными бесцветные клетки крови. В это же время наблюдаются движения хвоста, конец которого больше не прилегает к желтку.

При увеличении количества сомитов от 25-ти до 35-ти пар продолжает увеличиваться количество меланофоров, становятся различимы иридофоры. Кровь начинает циркулировать по сосудам тела и провизорной кровеносной системы, окружающей желточный мешок. Значительно увеличивается частота сокращений сердца и активность движения тела, которое полностью окружает желток, соприкасаясь головой и хвостом. Появляются первые хрящевые элементы скелета: трабекулы черепа, паракордалии и элементы висцеральных дуг.

После увеличения количества сомитов до дефинитивного количества ~40 пар происходит постепенное завершение эмбрионального развития, и формируется готовый к выклеву эмбрион (pre-hatching embryo). У эмбриона имеется развитая провизорная кровеносная система, заполненная красной кровью. Крупные подвижные глаза имеют металлический блеск и золотистый круг, окружающий зрачок. Сформированы и подвижны хвостовой и грудные плавники. Количество сердечных сокращений достигает 70–90 ударов в ми-

нуту. Желточный мешок значительно редуцируется. Длина и ширина головы эмбриона перед выклевом составляют приблизительно 0.85 мм.

Диапауза II характеризуется остановкой развития после формирования дефинитивного количества сомитов. Ей предшествует продолжительный период замедленного развития. Отличия от прямого развития начинают проявляться после 5-го дпо при количестве сомитов от 10-ти до 15-ти пар. В обоих случаях продолжают увеличиваться количество сомитов и рост эмбриона в длину. При этом размеры головы “быстрых” эмбрионов начинают существенно превышать $W = 0.2$ и $L = 0.4$ мм, в то время как размеры головы “медленных” особей практически не увеличиваются (рис. 2). Кроме того, у “медленных” эмбрионов не происходит развития меланофоров и провизорной кровеносной системы, а количество сокращений сердца значительно меньше, чем у “быстрых”. Таким образом, еще до наступления полной остановки развития при DII мы можем безошибочно отличать таких особей от эмбрионов с прямым типом развития (рис. 2).

Диапауза III характеризуется задержкой выклева полностью сформированных эмбрионов. Мы определяли данное состояние путем прямых наблюдений за особями, продолжающими оставаться в яйцевых оболочках. Важным индикатором, указывающим на состояние DIII, является резкое падение частоты сердечных сокращений вследствие снижения метаболизма зародыша (Martin, Podrabsky, 2017; Chalar et al., 2021). Особи с прямым развитием характеризуются частотой пульса 70–90 (и даже >100), в то время как частота пульса эмбрионов в DIII обычно снижается до 20–50, причем могут наблюдаться кратковременные остановки сердца.

Развитие эмбрионов в экспериментальных группах

Раннее развитие эмбрионов в контрольной группе и в группах с искусственно повышенным (НТР) и пониженным (РСРА) уровнем серотонина происходит сходным образом. К 5-му–6-му дпо эмбрионы из различных экспериментальных групп начинают значительно отличаться друг от друга размерами головы, а также частотой сердцебиения (рис. 3). Значения всех трех изученных признаков увеличиваются в ряду НТР — РСРА — Контроль. На данном этапе развития НТР эмбрионы являются достоверно менее развитыми, чем остальные группы ($p < 0.005$). РСРА эмбрионы достоверно уступают особям контрольной группы в значении признака W головы ($p < 0.005$), не демонстрируя значимых отличий по другим признакам.

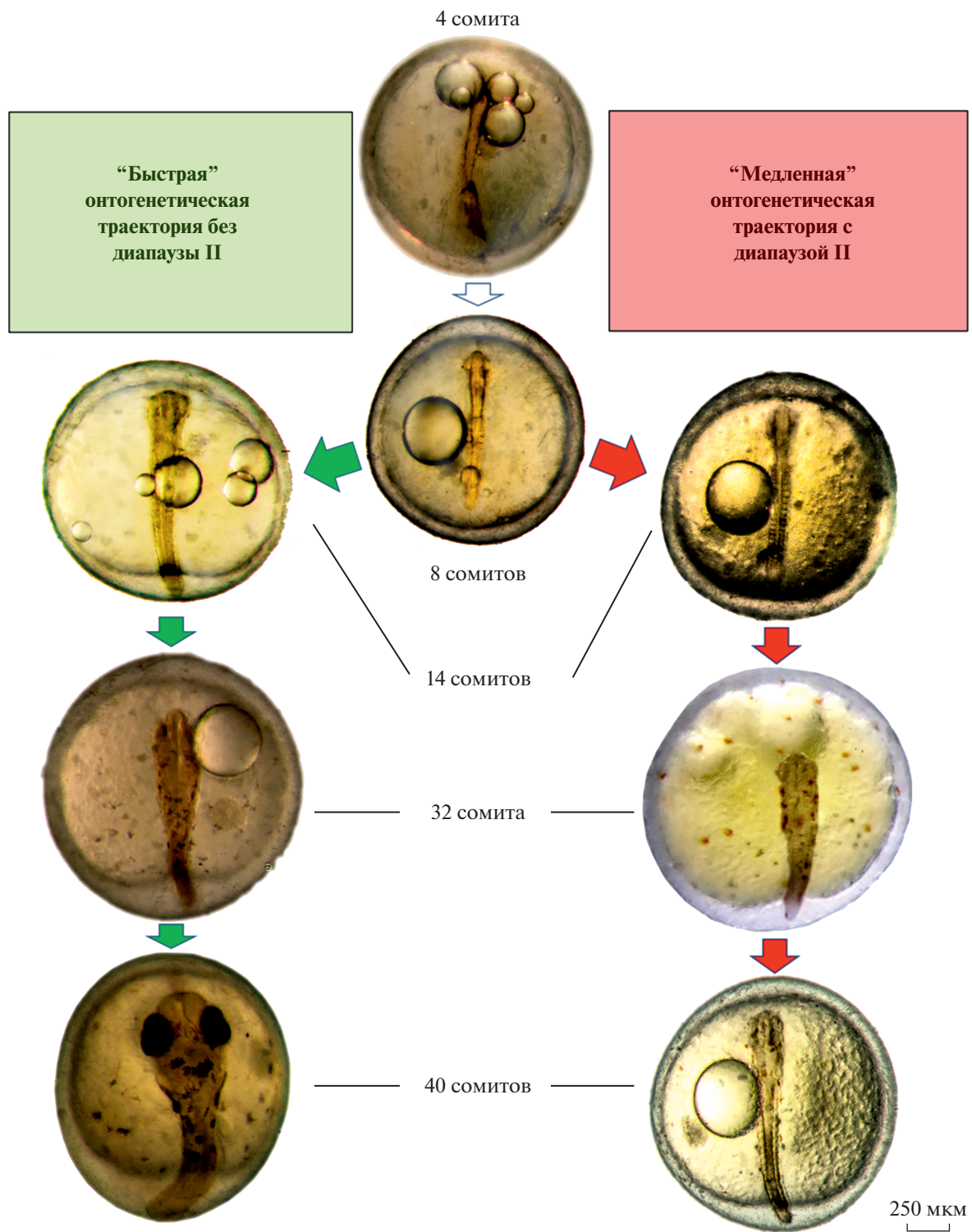


Рис. 2. Общая морфология эмбрионов *F. gardneri* с прямым типом развития и диапаузой II. Эмбрионы с различными онтогенетическими траекториями значительно отличаются размерами, пигментацией тела и глаз при одинаковом количестве сомитов.

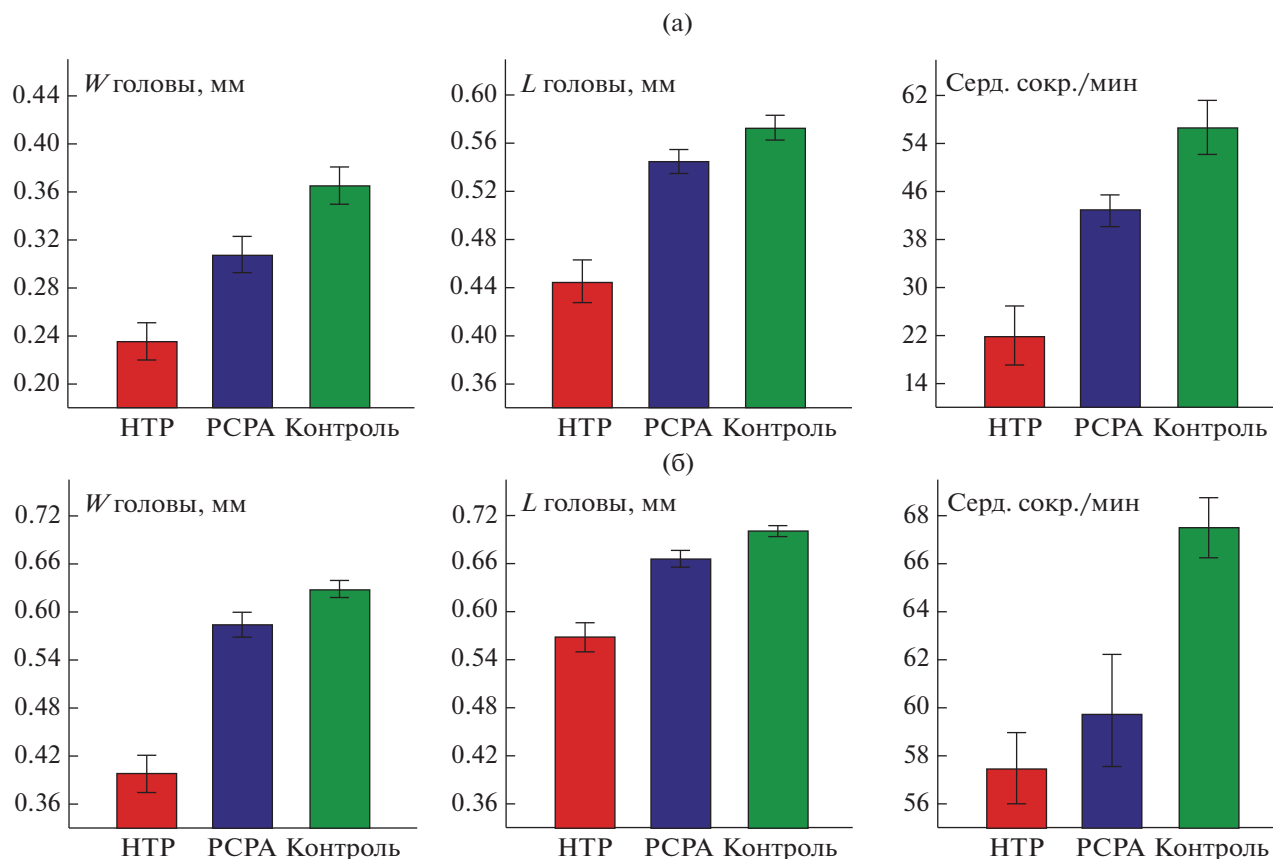


Рис 3. Средние значения и стандартные ошибки среднего для ширины и длины головы, а также частоты сердечных сокращений эмбрионов в возрасте 6 (а) и 10 (б) дней после оплодотворения в трех экспериментальных группах *F. gardneri*: Контроле, НТР и РСРА. L – длина головы, W – ширина головы.

На 10-й дпо НТР эмбрионы имеют достоверно меньшие L и W головы по сравнению с особями из других групп ($p < 0.001$), а также меньшую частоту сердцебиений по сравнению с контрольной группой ($p < 0.005$). При этом РСРА эмбрионы перестают значимо отличаться от контрольной группы (рис. 3).

Характерные фенотипические различия между эмбрионами с разными онтогенетическими траекториями – прямым развитием или развитием с ДП – начинают проявляться к 6-му дпо. Эмбрионы, находящиеся в состоянии ДП, имеют более 15-ти сомитов, относительно малые размеры головы, узкое тело, неразвитую провизорную кровеносную систему и не имеют меланофоров (рис. 2, 4). На 6 дпо в группах РСРА и Контроль число ДП эмбрионов составляет 11 и 9% соответственно. В НТР группе к 6-му дпо фенотипические признаки, характерные для ДП, еще не сформированы. На 10-й дпо доля ДП эмбрионов среди НТР группы составляет 14%, в РСРА группе – 4.5% и Контроле – 2%. Необходимо отметить, что на данной стадии (6-й–10-й дпо) наблюдалась вы-

сокая изменчивость темпов онтогенеза внутри групп. Наибольший диапазон наблюдается в контрольной группе, в которой есть как особи с ярко выраженной диапаузой, так и быстро развивающиеся эмбрионы (рис. 8). В РСРА группе различия в темпах онтогенеза менее выражены, чем в контроле. В НТР группе большинство эмбрионов развиваются относительно синхронно и заметно медленнее, чем в контрольной и РСРА группах (рис. 8).

Динамика выхода из яйцевых оболочек

Эмбриональное развитие *F. gardneri* в контрольной группе занимает от 14-ти до 63-х дней. Личинки покидают яйцевые оболочки очень неравномерно. Незначительное число особей (4%) выходит из икры на 14-й–16-й дпо. К 22-му дпо выклеивается 50% особей, с 22-го по 29-й дпо еще 25% особей. Оставшиеся в икре эмбрионы находятся в состоянии ДП (рис. 4), и их выклев растянут во времени (рис. 5, таб. 1).

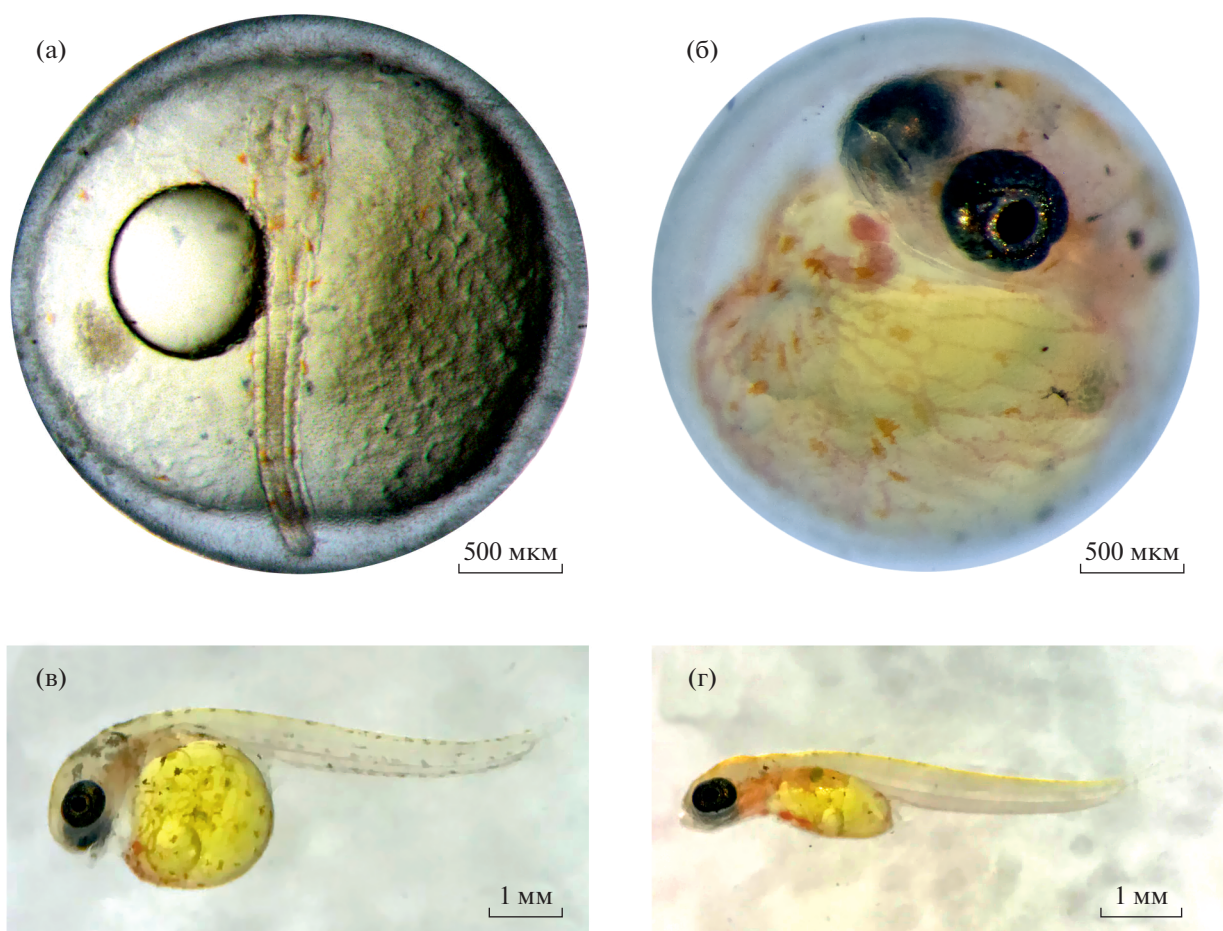


Рис. 4. Общая морфология *F. gardneri* в состоянии диапаузы и в момент выхода из яйцевых оболочек. (а) Диапауза DII (W головы = 0.2 мм, L головы = 0.45 мм); (б) диапауза DIII (W головы = 0.7 мм, L головы = 0.8 мм); (в) личинка с прямым развитием; (г) личинка, прошедшая DIII.

В НТР группе эмбриональное развитие занимает от 20-ти до 32-х дней. При этом появление большинства личинок (98%) происходило в период 20-го–26-го дпо (рис. 5). Единственный эмбрион с более продолжительным развитием покинул зародышевые оболочки к 32-му дпо, таким

образом, особи в состоянии DIII практически отсутствовали (рис. 5, табл. 1).

В РСРА группе эмбриональное развитие занимает от 18-ти до 51-го дня. К 25-му дпо выклеваются приблизительно 40% личинок, к 32-му дпо –

Таблица 1. Временные характеристики динамики выхода личинок из яйцевых оболочек в трех экспериментальных группах *F. gardneri*. дпо – дней после оплодотворения

	Контроль	НТР	РСРА
Возраст выклева (дпо)	14–63	20–32	18–51
Среднее значение	26.3 ± 0.88	23.4 ± 0.25	29.0 ± 1.51
Стандартное отклонение	10.71	1.79	8.28
Медиана	23	23	28
Коэффициент асимметрии	1.35 ± 0.2	2.16 ± 0.33	0.63 ± 0.43
Коэффициент эксцесса	1.18 ± 0.4	9.58 ± 0.66	0.1 ± 0.83

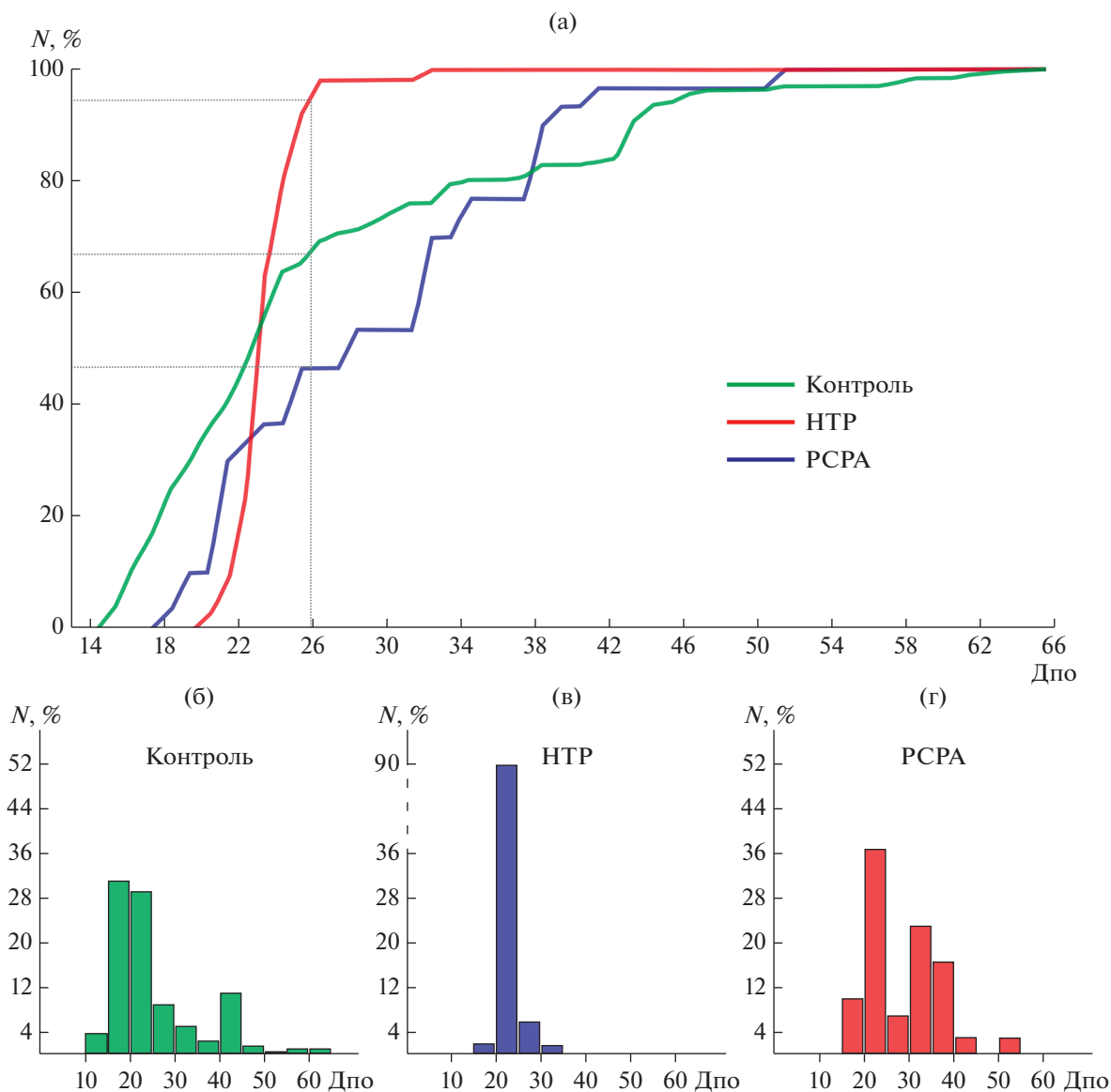


Рис. 5. Динамика выхода и частотные гистограммы распределения времени выхода личинок из яйцевых оболочек в трех экспериментальных группах *F. gardneri*. (а) Динамика выхода личинок; (б, в, г) – частотное распределение времени выхода личинок в контрольной, НТР и РСРА группах, соответственно. дпо – дней после оплодотворения, $N, \%$ – процент особей от общего числа личинок в группе.

еще 30% (рис. 5). Оставшиеся эмбрионы находятся в состоянии ДИИ и постепенно покидают зародышевые оболочки в течение следующих 20 дней (рис. 5).

Попарное сравнение времени появления личинок в экспериментальных группах с использованием непараметрического критерия U Манна–Уитни выявило значимые различия в динамике выклева между контрольной и РСРА группами ($p < 0.05$). Коэффициенты асимметрии и эксцесса распределения во всех группах наглядно демонстрируют, что динамика выклева в РСРА и НТР группах отличается от Контроля (таб. 1). В группе РСРА

выклев большей части эмбрионов отстает и растянут во времени. В то же время в группе НТР выклев происходит очень синхронно в короткий промежуток времени (рис. 5, 8).

Морфология личинок в момент вылупления

Несмотря на существенную изменчивость средней продолжительности эмбрионального развития, личинки, покидающие яйцевые оболочки, значимо не отличаются друг от друга размерами. Во всех экспериментальных группах SL личинок составляла 3.8–4.25 мм (рис. 6). Корреляция раз-

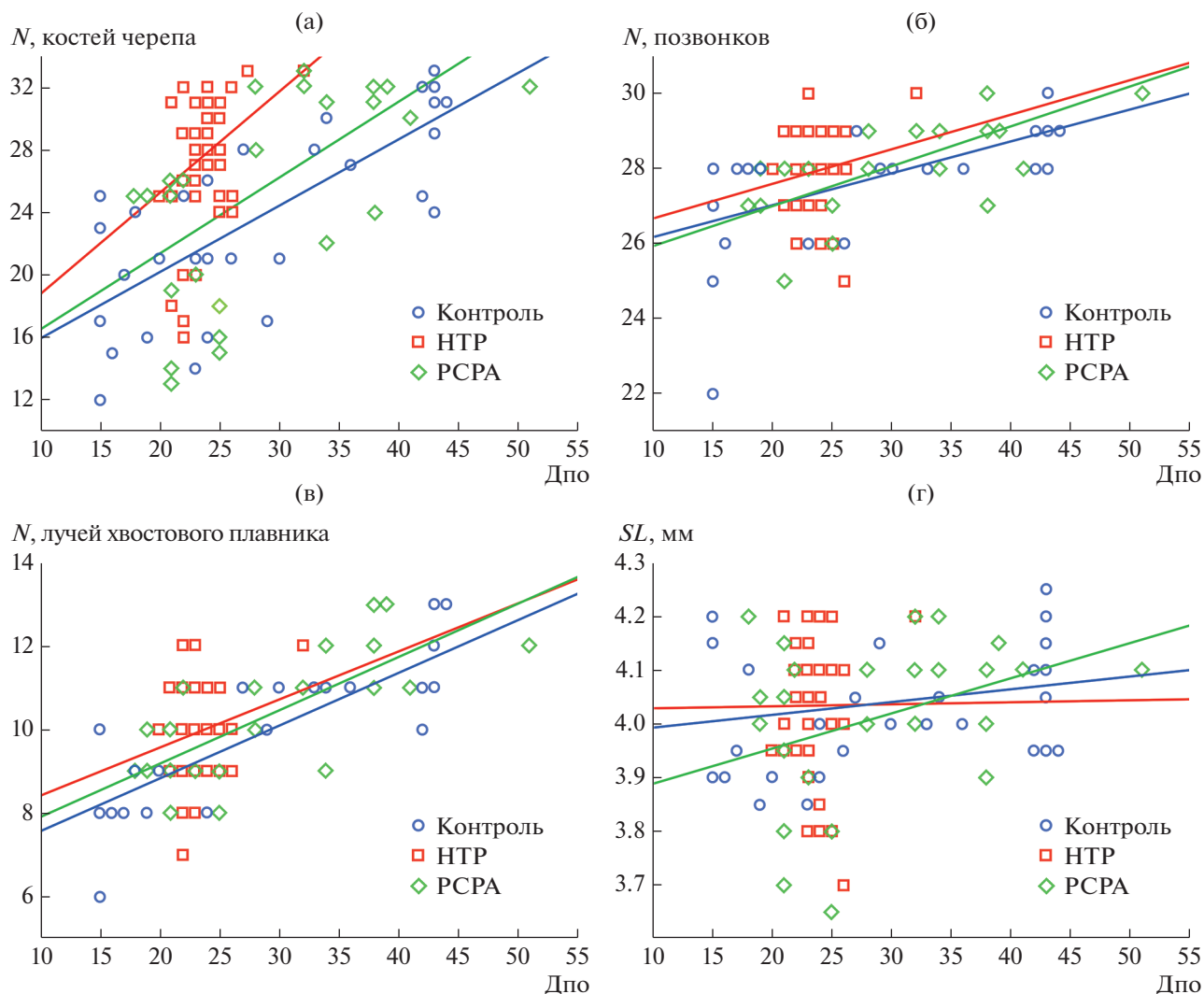


Рис. 6. Диаграммы рассеяния, показывающие зависимость количества костей черепа (а), позвонков (б), лучей хвостового плавника (в) и стандартной длины тела (г) от возраста у личинок трех экспериментальных групп. Для всех изучаемых признаков изображены линии регрессии. (а) регрессионный коэффициент; Дпо – дней после оплодотворения, N – число анализируемых структур, SL – длина личинки.

меров и возраста эмбрионов не является статистически значимой во всех экспериментальных группах (рис. 6, табл. 2). Лишь в РСРА группе отмечается слабая положительная коррелятивная связь – SL незначительно увеличивается с возрастом (рис. 6, табл. 2). Единственным внешним различием эмбрионов, выходящих из яйца раньше или позже, является состояние желточного мешка. У эмбрионов, покинувших оболочку раньше, он значительно меньше редуцирован (рис. 4в, 4г).

F. gardneri, как и остальные killifish, демонстрирует высокую степень эмбрионизации онтогенеза. Личинки покидают яйцевые оболочки с хорошо сформированным костным скелетом и могут сразу переходить на активное питание. При этом состав краниального и посткраниального скелета

отличается высокой вариабельностью (рис. 7). К моменту выклева череп личинок насчитывает от 12-ти до 33-х различных костей, число позвонков варьирует от 21-го до 30-ти, а лучей хвостового плавника – от 6-ти до 13-ти (табл. 3).

Расчет коэффициентов корреляции Спирмена показал, что в контрольной группе параметры развития скелета: число костей черепа, позвонков и лучей хвостового плавника (лепидотрихий) имеют высокую положительную корреляцию между собой и с возрастом. SL демонстрирует слабую положительную корреляцию только с числом костей черепа и лучей хвостового плавника (табл. 4).

Анализ зависимости признаков скелета от возраста в разных экспериментальных группах показал, что контрольная и РСРА группы характери-

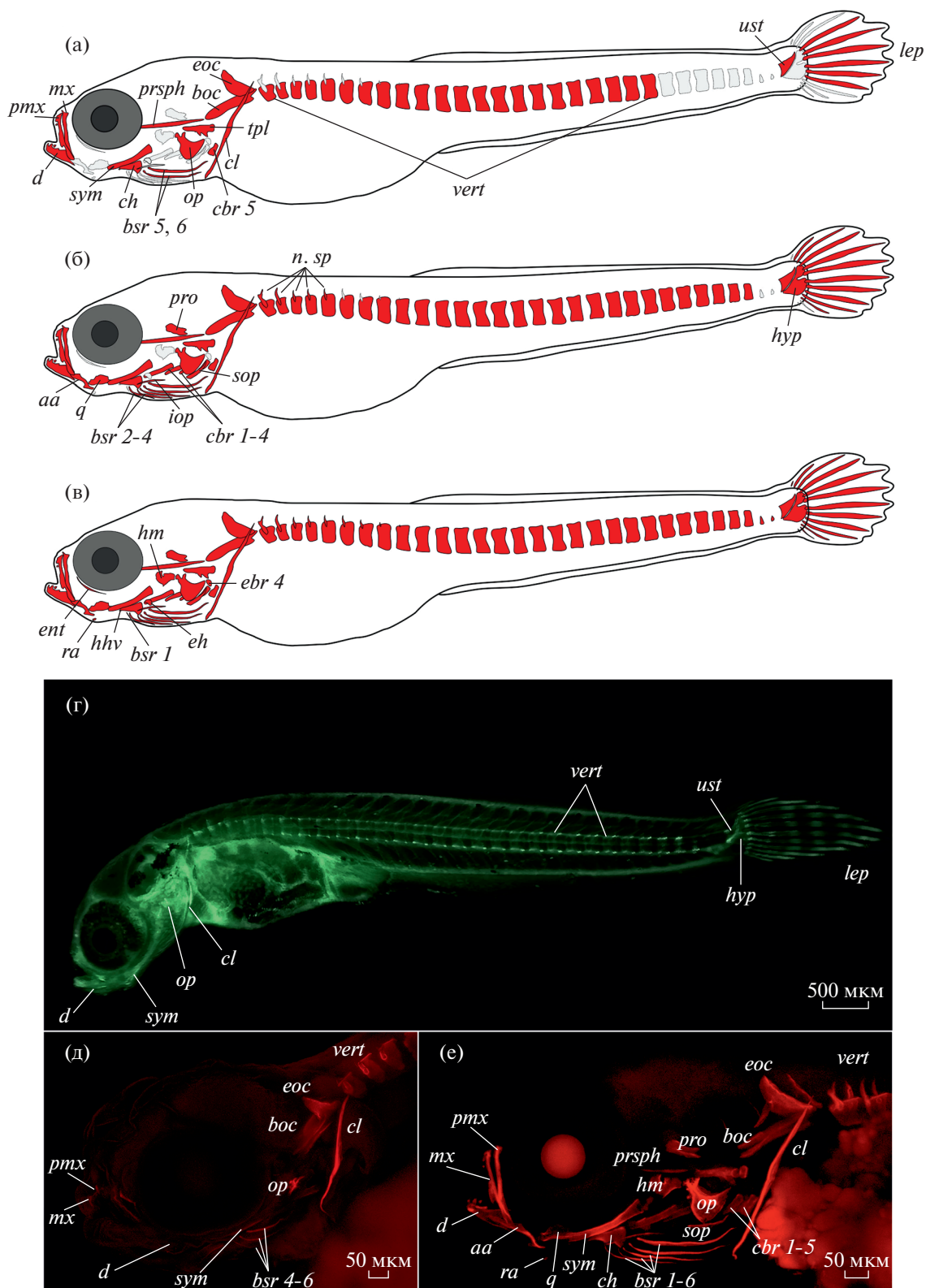


Рис. 7. Состояние костного скелета личинок *F. gardneri* в момент выклева. Схематическое изображение состояния скелета личинки в момент выхода из яйцевых оболочек: (а) слабо развитая личинка, (б) промежуточное состояние и (в) сильно развитая личинка. (г) Тотальная прижизненная окраска личинки кальцеином. (д–е) Тотальные препараты головы слабо- и сильно развитой личинки, окрашенные ализарином. *aa* – anguloarticulare; *boc* – basioccipitale; *bsr* – branchiostegalia; *cbr* – ceratobranchialia; *ch* – ceratohyale; *cl* – cleithrum; *d* – dentale; *eoc* – exoccipitale; *hm* – hyomandibulare; *hyp* – hypuralia; *lep* – lepidotrichia; *mx* – maxillare; *n.sp.* – нейральные отростки; *op* – operculum; *pmx* – praemaxillare; *pro* – prooticum; *prsph* – parasphenoideum; *q* – quadratum; *ra* – retroarticulare; *sop* – suboperculum; *sym* – symplecticum; *ust* – urostyl; *vert* – vertebrae.

Таблица 2. Состояние скелета личинок *F. gardneri* в момент выклева. a – коэффициент регрессии; N – число анализируемых структур, p – уровень значимости; R^2 – коэффициент детерминации, SL – длина личинки

	Контроль			НТР			РСРА		
	a	p	R^2	a	p	R^2	a	p	R^2
N костей черепа	0.423	≤0.001	0.578	0.646	0.032	0.033	0.487	≤0.001	0.348
N позвонков	0.085	≤0.001	0.483	0.092	0.257	0.007	0.106	≤0.001	0.442
N лучей хвоста	0.082	≤0.001	0.791	0.115	0.189	0.006	0.139	≤0.001	0.575
SL	0.0024	0.174	0.054	0.0004	0.966	0.004	0.065	0.061	0.12

Таблица 3. Состояние скелета личинок *F. gardneri* в трех экспериментальных группах в момент выхода из яйцевых оболочек

	Кости черепа			Позвонки			Лучи хвоста		
	Контроль	НТР	РСРА	Контроль	НТР	РСРА	Контроль	НТР	РСРА
Число структур в момент выклева (min–max)	12–33	16–33	13–33	22–30	25–30	25–30	6–13	7–12	8–13
Среднее	23.95	27.47	25.7	27.78	27.92	27.97	9.94	9.98	10.33
Медиана	24.5	28	26	28	28	28	10	10	10.5
Стандартное отклонение	5.94	3.85	6.43	1.5	1.02	1.33	1.62	1.09	1.42
Коэффициент асимметрии	-0.23 ± 0.39	-1.31 ± 0.33	-0.6 ± 0.43	-1.82 ± 0.39	-0.43 ± 0.33	-0.51 ± 0.43	-0.2 ± 0.39	-0.35 ± 0.33	0.05 ± 0.43
Коэффициент эксцесса	-1.03 ± 0.77	1.75 ± 0.66	-0.98 ± 0.83	5.43 ± 0.77	0.51 ± 0.66	-0.06 ± 0.83	-0.32 ± 0.77	0.07 ± 0.66	-0.8 ± 0.83

зуются сходными регрессионными коэффициентами и достаточно высокими коэффициентами детерминации (табл. 2). Таким образом, в обеих группах личинки одинакового возраста имеют сходное число костей черепа, позвонков и лучей хвоста. На это указывают и характер расположения регрессионных прямых и облаков точек на приведенных диаграммах рассеяния (рис. 6). Парные сравнение групповых средних показало, что на заданном уровне значимости $p = 0.05$ единственное значимое различие наблюдалось для признака “число костей черепа” между группами “НТР” (среднее = 27.47) и контрольной группой

(среднее = 23.95). Эмбрионы от матерей, получавших НТР, к моменту выклева имеют в среднем больший набор краниальных окостенений, чем в норме (рис. 6, табл. 3). Данные результаты хорошо согласуются и с приведенными регрессионными коэффициентами (табл. 2).

В НТР группе коэффициенты детерминации значительно меньше, чем в других группах (табл. 2). Это обусловлено значительной вариабельностью зависимых признаков при существенно меньшей вариабельности продолжительности эмбрионального периода. В данной группе статистически значимой является только связь

Таблица 4. Корреляционная матрица (корреляция Спирмена) для особей из контрольной группы. Жирным шрифтом выделены статистически значимые коэффициенты детерминации (R_s). N – число анализируемых структур, SL – длина личинки

	дпо	SL	N костей черепа	N позвонков
SL	0.193			
N костей черепа	0.76	0.419		
N позвонков	0.695	0.283	0.813	
N лучей хвоста	0.89	0.377	0.863	0.733

между числом костей черепа и возрастом ($p < 0.05$) (табл. 2). Анализ взаимного расположения регрессионных прямых и сравнение регрессионных коэффициентов демонстрируют, что череп НТР личинок характеризуется большим числом костей черепа, чем череп личинок того же возраста из других групп. Даже наиболее рано вышедшие из икры НТР личинки редко имеют минимальный набор скелетных элементов, отмечаемый у ранних личинок контрольной группы (рис. 6, табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное изменение уровня серотонина у самок *F. gardneri* вызывает изменение временных характеристик онтогенеза их потомства, т.е. гетерохронии, и отражается на уровне его онтогенетической и фенотипической изменчивости (рис. 8). Контрольная группа характеризуется высокой изменчивостью онтогенеза, типичной для многих представителей killifish (Podrabsky et al., 2010a; Furness, 2015; Dominguez-Castanedo et al., 2017; Naumann, Englert, 2018): большинство эмбрионов развивается без пауз; небольшая часть проходит диапаузу DII; остальные особи демонстрируют отложенный выход из икры, т.е. проходят диапаузу DIII (рис. 8). В результате, выклев очень растянут во времени и личинки сильно различаются фенотипически, так как степень их развития напрямую зависит от возраста. Ранние личинки характеризуются слабой степенью развития и оксификации скелета и большим желточным мешком (рис. 4, 7). Поздние, наоборот, обладают хорошо развитым скелетом и сильно редуцированным желточным мешком (рис. 4, 7). Считается, что подобная онтогенетическая пластичность позволяет killifish минимизировать риски гибели потомства при наступлении неблагоприятных условий (Podrabsky et al., 2010b; Anderson, Podrabsky, 2014; Martin, Podrabsky, 2017; Chalar et al., 2021).

В потомстве самок, обработанных биохимическим предшественником серотонина (НТР), наблюдаются гетерохронии и резкое сокращение онтогенетической и фенотипической изменчивости. У потомков происходит снижение темпов роста и частоты сердечных сокращений на ранних этапах развития (рис. 3), увеличение доли особей в состоянии DII и несколько более позднее, по сравнению с контрольной группой, начало выклева (рис. 5, табл. 1). При этом отмечается синхронизация онтогенеза, приводящая в итоге к значимому сокращению временного диапазона выхода личинок из икры и снижению их фенотипической изменчивости (рис. 5). Среди личинок нет особей с большим желточным мешком и небольшим числом костных структур, т.е. личинки

находятся на более продвинутой стадии развития, чем в контрольной группе (табл. 3).

Ход эмбриогенеза рыб, матери которых были обработаны агентом, снижающим уровень серотонина в организме (PCPA), близок к контролю (рис. 3). Однако следует отметить, что динамика выхода из икры в PCPA группе значимо отличается от контрольной (рис. 5, табл. 1). Контрольная группа демонстрирует резко выраженный пик выклева личинок с прямым развитием. За этим пиком следует медленный и затянутый выход личинок, проходящих DIII (рис. 5). В PCPA группе доля эмбрионов с прямым развитием существенно ниже, а процент эмбрионов, проходящих DIII, значимо выше. В результате, пик массового выхода личинок выражен в этой группе заметно слабее (рис. 5, 8). При этом не наблюдается увеличения временного диапазона выклева, но происходит перераспределение плотности появления личинок с более ранних на более поздние сроки (рис. 5).

Полученные результаты не позволяют судить о механизмах, лежащих в основе наблюдаемых эффектов, возникающих вследствие изменения уровня серотонина матери. Однако, основываясь на данных о взаимодействии серотонинергической системы рыб и различных типов эндокринных клеток (Canosa et al., 2007; Lillesaar, 2011; Prasad et al., 2015; McDonald, 2017; Thompson, Vijayan, 2022) мы можем предположить, что серотонин матери выступает в роли эпигенетического сигнала, модулирующего онтогенез потомства. Известно, что у рыб высокий уровень серотонина подавляет синтез соматотропного гормона (Wong et al., 1998), который, в свою очередь, определяет активность экспрессии IGF-I (Triantaphyllopoulos et al., 2020). Таким образом, серотонин может изменять уровень IGF-I – фактора, определяющего онтогенетическую траекторию аннуальных killifish (Karp, 2021). Исходя из этого, замедление раннего онтогенеза у эмбрионов, полученных от матерей с высоким уровнем серотонина, может быть вызвано снижением активности соматотропной оси, а увеличение среди них числа особей в состоянии DII может быть вызвано снижением уровня IGF-I.

Предполагаемая связь между серотонином и IGF-I может объяснить и впадение в диапаузу DII эмбрионов в естественных условиях, наблюдаемую при резком снижении концентрации растворенного кислорода (Chalar et al., 2021). Серотонин является основной сигнальной молекулой, используемой нейроэндокринными гипоксиячувствительными клетками рыб (Hockman et al., 2017). При снижении уровня кислорода происходит выброс в кровь серотонина, что может оказывать влияние на активность экспрессии IGF-I и, как следствие, вызывать DII.

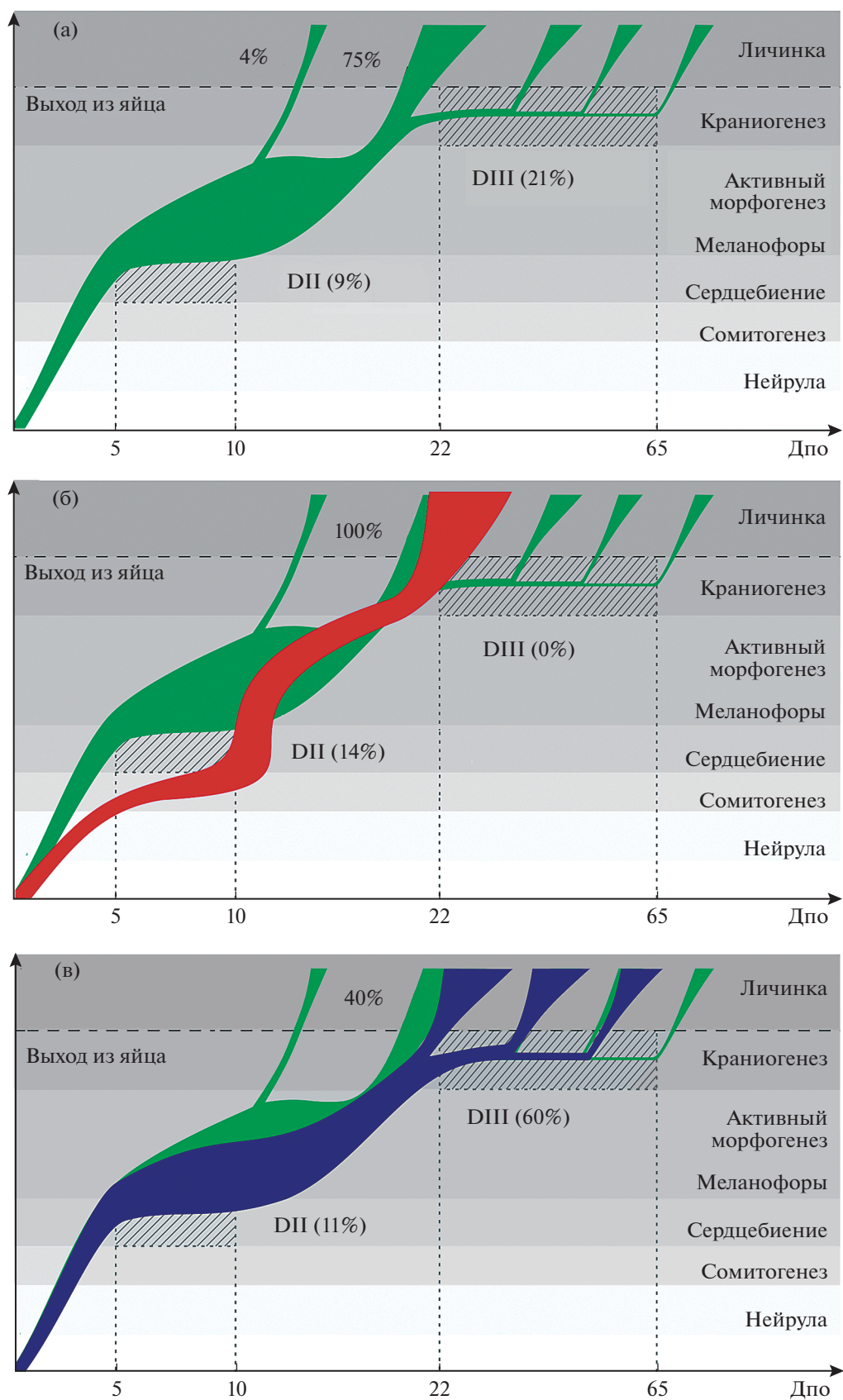


Рис. 8. Схематичное представление онтогенетических траекторий в трех экспериментальных группах *F. gardneri*. (а) Контрольная группа, (б) НТР группа, (в) РСРА группа.

Примечательно, что гетерохронии, индуцированные изменениями уровня серотонина матери, ранее отмечались у брюхоногих моллюсков, характеризующихся выраженными изменениями жизненных стратегий потомства в зависимости от сезона (Glebov et al., 2014; Ivashkin et al., 2015; Voronezhskaya, 2021). Это позволяет предположить, что онтогенетические и фенотипические эффекты, вызванные флуктуациями уровня серотонина матери, могут иметь большое адаптивное значение и для killifish, населяющих эфемерные водоемы с четко выраженной сезонной динамикой гидрологических, гидрохимических условий и трофности (Williams, 1987; Podrabsky et al., 1997).

Изменения температуры, содержания кислорода в воде, состава и обилия пищи, а также социальные факторы оказывают влияние на уровень серотонина взрослых рыб (Winberg et al., 1991; Prasad et al., 2015; Winberg, Thornqvist, 2016; Evsiukova et al., 2021; Nonnis et al., 2021; Uyttebroek et al., 2022). Мы предполагаем, что на пике трофности эфемерных водоемов, обычно наступающем в конце влажного периода, у самок происходит хроническое повышение уровня серотонина, наблюдаемое у рыб при обилии пищи (Uyttebroek et al., 2022), и усложнении социальных взаимоотношений (Backström, Winberg, 2017). Высокий уровень серотонина стимулирует синтез гонадотропных гормонов матери (Prasad et al., 2015), что ускоряет созревание половых продуктов, а также и ускоряет и синхронизирует онтогенез потомства. В результате личинки выходят из яичевых оболочек на пике трофности водоема. В другие сезоны, когда внешние условия могут быть не столь благоприятными и/или часто меняющимися (начало влажного сезона, сухой сезон), активность синтеза серотонина в организме матери может быть снижена. В частности, снижение уровня серотонина отмечалось у рыб при резких кратковременных колебаниях температуры (Nonnis et al., 2021). В таких условиях может иметь свои преимущества растянутый во времени выклев личинок, который увеличивает шансы на выживание отдельных особей.

В пользу гипотетической “сезонности” уровня серотонина в популяциях аннуальных killifish говорит и то, что во время сухого сезона увеличивается доля “возрастных” самок (Reichard, 2015). При этом в потомстве таких самок снижается доля эмбрионов, реализующих быструю онтогенетическую траекторию, и появляется больше особей, проходящих позднюю диапаузу DIII (собственные наблюдения; Podrabsky et al., 2010a).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные наглядно свидетельствуют, что уровень серотонина в организме

матери может прямо или косвенно выступать в роли эпигенетического сигнала, определяющего онтогенетическую траекторию потомства. Пути и механизмы передачи данного сигнала от матери к потомкам, его мишени у развивающихся эмбрионов, а также механизмы реакции эмбрионов на сигнал остаются неясными и требуют дальнейшего изучения. Несмотря на это, представленные результаты открывают новую страницу в понимании роли серотонина в процессах адаптации и эволюции killifish.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность заведующему лаборатории Экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации ИПЭЭ РАН Е.Ю. Крысанову и главному специалисту А.В. Никифорову за помощь с получением живых объектов исследования. Кроме того, авторы признательны заведующему лаборатории Проблем экологии и эволюции ИПЭЭ РАН С.В. Смирнову и заведующей лабораторией Сравнительной физиологии развития ИБР РАН Е.Е. Воронежской за ценные замечания в процессе обсуждения результатов. Микроскопическое исследование образцов проводилось с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

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

В.Б. Борисов провел основное экспериментальное исследование и статистическую обработку данных. Все авторы участвовали в разработке эксперимента, проведении микроскопических исследований образцов, подготовке иллюстраций, обсуждении результатов и подготовке конечного варианта рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы выполнены в рамках Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0019 и гранта РФФИ № 20-04-00655.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Airhart M., Lee D., Tracy D. et al. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish // *Neurotoxicology and Teratology*. 2012. V. 34. P. 152–160.

- Anderson S., Podrabsky J. The effects of hypoxia and temperature on metabolic aspects of embryonic development in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* // J. Comp. Physiol. B. 2014. V. 184. P. 355–370.
- Andreatta G., Kyriacou C., Flatt T. et al. Aminergic signaling controls ovarian dormancy in drosophila // Sci. Rep. 2018. 8: 2030.
- Astre G., Moses E., Harel I. Chapter 11 – The African turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*): biology and research applications, Editor(s): Livia D'Angelo, Paolo de Girolamo // Laboratory Fish in Biomedical Research, Academic Press, 2022. P. 245–287.
- Backström T., Winberg S. Serotonin coordinates responses to social stress-what we can learn from fish // Front. Neurosci. 2017. 11: 595.
- Barreiro-Iglesias A., Mysiak K., Scott A. et al. Serotonin promotes development and regeneration of spinal motor neurons in zebrafish // Cell Rep. 2015. V. 13. P. 924–932.
- Berois N., Garcia G., De Sá R.O. A global community effort to decipher the unique biology of annual killifish // Developmental Dynamics. 2017. V. 246. P. 807–811.
- Buznikov G., Lambert H., Lauder J. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell Tissue Res. 2001. V. 305. P. 177–186.
- Canosa L., Chang J., Peter R. Neuroendocrine control of growth hormone in fish // Gen. Comp. Endocrinol. 2007. V. 15. P. 1–26.
- Chalar C., Clivio G., Montagne J. et al. Embryonic developmental arrest in the annual killifish *Austrolebias charrua*: a proteomic approach to diapause III // PLoS One. 2021. 16(6): e0251820.
- Côté F., Fligny C., Bayard E. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 329–334.
- Di Genova A., Nardocci G., Maldonado-Agurto R. et al. Genome sequencing and transcriptomic analysis of the Andean killifish *Orestias ascotanensis* reveals adaptation to high-altitude aquatic life // Genomics. 2022. V. 114. P. 305–315.
- Dolfi L., Ripa R., Antebi A. et al. Cell cycle dynamics during diapause entry and exit in an annual killifish revealed by FUCCI technology // EvoDevo. 2019. 10: 29.
- Dominguez-Castanedo O., Rosales-Torres A.M., Uribe M.C. Life history strategies of annual killifish *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae) in a seasonally ephemeral water body in Veracruz, México // Environmental Biology of Fishes. 2017. V. 100. P. 995–1006.
- Du S.J., Frenkel V., Kindschi G., Zohar Y. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein // Dev. Biol. 2001. V. 238. P. 239–246.
- Eide M., Zhang X., Karlson O. et al. The chemical defense of five model teleost fish // Sci. Rep. 2021. 11: 10546.
- Evsukova V., Kulikova E., Kulikov A. Age-related alterations in the behavior and serotonin-related gene mRNA levels in the brain of males and females of short-lived Turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*) // Biomolecules. 2021. 11(10): 1421.
- Faria M., Prats E., Bellot M. et al. Pharmacological modulation of serotonin levels in zebrafish larvae: lessons for identifying environmental neurotoxicants targeting the serotonergic system // Toxics. 2021. 9(6): 118.
- Furness A. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause // Biol. Rev. 2015. V. 91. P. 796–812.
- Glebov K., Voronezhskaya E., Khabarova M. et al. Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis* (Mollusca) // BMC Dev. Biol. 2014. 14: 14.
- Hockman D., Burns A., Schlosser G. et al. Evolution of the hypoxia-sensitive cells involved in amniote respiratory reflexes // eLIFE. 2017. 6: e21231.
- Hu C., Brunet A. The African turquoise killifish: a research organism to study vertebrate aging and diapause // Aging Cell. 2018. 17(3): e12757.
- Ivashkin E., Khabarova M., Melnikova V. et al. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Reports. 2015. V. 7(12). P. 1144–1158.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A. et al. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // ACS Chemical Neuroscience. 2019. V. 10. P. 3888–3899.
- Jonsson E., Björnsson B. Physiological functions of growth hormone in fish with special reference to its influence on behavior // Fisheries Science. 2002. V. 68. P. 742–748.
- Karp X. Hormonal regulation of diapause and development in nematodes, insects, and fishes // Front. Ecol. Evol. 2021. 9: 735924.
- Lillesaar C. The serotonergic system in fish // J. Chem. Neuroanat. 2011. V. 41. P. 294–308.
- Martin K., Podrabsky J. Hit pause: developmental arrest in annual killifishes and their close relatives // Developmental Dynamics. 2017. V. 246. P. 858–866.
- Maximino C., Puty B., Benzecry R. et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models // Neuropharmacology. 2013. V. 71. P. 83–97.
- McDonald D. An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2017. V. 197. P. 19–31.
- Musumeci G., Trovato F., Avola R. et al. Serotonin/growth hormone/insulin-like growth factors axis on pre- and post-natal development: A contemporary review // OA Anatomy. 2013. 1(2): 12.
- Nardi I., De Lucchini S., Naef V. et al. Serotonin signaling contribution to an evolutionary success: the jaw joint of vertebrates // Eur. Zool. J. 2017. V. 84. P. 19–25.
- Naumann B., Englert C. Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes: Phylogenetic distribution

- and evolutionary significance of a unique feature // *Dev. Biol.* 2018. V. 442. P. 69–79.
- Nonnis S., Angiulli E., Maffioli E. et al. Acute environmental temperature variation affects brain protein expression, anxiety and explorative behaviour in adult zebrafish // *Sci. Rep.* 2021. 11: 2521.
- Peters N. Embryonic adaptations of oviparous cyprinodonts from waters that are periodically desiccated // *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie.* 1963. V. 48. P. 257–313.
- Podrabsky J., Hrbek T., Hand, S. Physical and chemical characteristics of ephemeral pond habitats in the Maracaibo basin and Llanos region of Venezuela // *Hydrobiologia.* 1997. V. 362. P. 67–77.
- Podrabsky J., Garrett I., Kohl Z. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* // *J. Exp. Biol.* 2010a. V. 213. P. 3280–3288.
- Podrabsky J., Tingaud-Sequeira A., Cerda J. Metabolic dormancy and responses to environmental desiccation in fish embryos // *Dormancy and resistance in harsh environments. Topics in Current Genetics / Eds. Lubzens E., Cerda J., Clark M.* 2010b. P. 203–226.
- Podrabsky J., Riggs C., Wagner J. Tolerance of environmental stress // *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution / Eds. Berois N., Garcia G., De Sa R.O.* 2015. P. 159–184.
- Poeschla M., Valenzano D. The turquoise killifish: a genetically tractable model for the study of aging // *J. Exp. Biol.* 2020. 223 (Suppl. 1): jeb209296.
- Prasad P., Ogawa S., Parhar I.S. Serotonin reuptake inhibitor citalopram inhibits GnRH synthesis and spermatogenesis in the male zebrafish // *Biol. of Reprod.* 2015. V. 93(4): 102.
- Reichard M. Annual fishes: Life history strategy, diversity, and evolution. *The Evolutionary Ecology of African Annual Fishes / Eds. Berois N., Garcia G., De Sa R.O.* 2015. P. 133–158.
- Reid N., Jackson C., Gilbert D. et al. The landscape of extreme genomic variation in the highly adaptable Atlantic killifish // *Genome Biol. Evol.* 2017. V. 9. P. 659–676.
- Romero-Reyes J., Molina-Hernandez A., Diaz N.F. et al. Role of serotonin in vertebrate embryo development // *Rep. Biol.* 2021. 21(1): 100475.
- Romney A., Podrabsky J. Transcriptomic analysis of maternally provisioned cues for phenotypic plasticity in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus* // *EvoDevo.* 2017. 8: 6.
- Romney A., Davis E., Corona M. et al. Temperature-dependent vitamin D signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in an annual killifish // *PNAS.* 2018. V. 115. P. 12763–12768.
- Singh P., Reeves A., Contrepolis K. et al. Evolution of diapause in the African turquoise killifish by remodeling ancient gene regulatory landscape // *bioRxiv* 2021: 10.25.465616.
- Thompson W., Vijayan M. Antidepressants as endocrine disrupting compounds in fish // *Front. in Endocrinol.* 2022. 13: 895064.
- Triantaphyllopoulos K., Cartas D., Miliou H. Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: how can aquaculture industry benefit? // *Rev. Aquacult.* 2020. V. 12. P. 1637–1662.
- Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: Long-lasting regulation of activity and development // *Acta Neurobiol. Exp.* 1996. V. 56. P. 619–636.
- Uyttebroek L., Van Remoortel S., Buysse L. et al. The effect of diet induced obesity on serotonin in zebrafish // *J. Cell Signal.* 2022. V. 3. P. 115–128.
- Valenzano D., Benayoun B., Singh P. et al. The African turquoise killifish genome provides insights into evolution and genetic architecture of lifespan // *Cell.* 2015. V. 163. P. 1539–1554.
- Voronezhskaya E. Maternal serotonin: shaping developmental patterns and behavioral strategy on progeny in molluscs // *Front. Ecol. Evol.* 2021. V. 9. P. 7–14.
- Voronezhskaya E., Melnikova V., Ivashkin E. Monoamines as adaptive regulators of development: The phenomenon and its mechanisms of action // *Neuroscience and Behav. Phys.* 2022. V. 51. P. 1278–1285.
- Wagner J., Podrabsky J. Extreme tolerance and developmental buffering of UV-C induced DNA damage of the annual killifish *Australofundulus limnaeus* // *J. Exp. Zool. Part A: Ecol. Gen. and Phys.* 2015. V. 323. P. 10–30.
- Walker M., Kimmel C. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae // *Biotech. Histochem.* 2007. V. 82. P. 23–28.
- Whitehead A., Roach J., Zhang S. et al. Genomic mechanisms of evolved physiological plasticity in killifish distributed along an environmental salinity gradient // *PNAS.* 2011. V. 108. P. 6193–6198.
- Willemsen D., Cui R., Reichard M. et al. Intra-species differences in population size shape life history and genome evolution // *eLife.* 2020. 9: e55794.
- Williams D. *The ecology of temporary waters* // Springer Dordrecht. 1987. P. 206.
- Winberg S., Nilsson G., Olsén K. Social rank and brain levels of monoamines and monoamine metabolites in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) // *J. Comp. Physiol. A.* 1991. V. 168. P. 241–246.
- Winberg S., Thörnqvist P.-O. Role of brain serotonin in modulating fish behavior // *Curr. Zool.* 2016. V. 62. P. 317–323.
- Woll S., Podrabsky J. Insulin-like growth factor signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* // *J. Exp. Biol.* 2017. V. 220. P. 2777–2786.
- Wong A., Murphy C., Chang J. et al. Direct actions of serotonin on gonadotropin-II and growth hormone release from goldfish pituitary cells: interactions with gonadotropin-releasing hormone and dopamine and further evaluation of serotonin receptor specificity // *Fish Physiol. and Biochem.* 1998. V. 19. P. 23–34.
- Wourms J. *The developmental biology of annual fishes. I. Developmental biology of annual fishes I. Stages in the normal development of Austrofundulus myersi* Dahl // *J. Exp. Zool.* 1972a. V. 182. P. 143–168.
- Yin J.-A., Liu X.-J., Yuan J. et al. Longevity manipulations differentially affect serotonin/dopamine level and behavioral deterioration in aging *Caenorhabditis elegans* // *The J. Neuroscience.* 2014. V. 34. P. 3947–3958.

Experimental Increase and Decrease in Serotonin Level of Females Regulate the Developmental Trajectory of Their Offspring in Fish with Embryonic Diapause

V. B. Borisov^{1, *} and F. N. Shkil^{1, 2}

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: v.borisov.sev@gmail.com

Killifishes (Cyprinodontiformes; Teleostei) inhabiting ephemeral water bodies are characterized by developmental plasticity, the ability to adaptively change the developmental trajectory in response to environmental cues. Changes in developmental trajectories occur due to embryonic diapauses, delays or arrests of embryonic development, which increase the chance of embryos to survive under unpredictable or adverse environmental conditions. Here, we studied normal development of the West African killifish *Fundulopanchax gardneri* and experimentally tested the effects of pharmacological increase (HTP group) and decrease (PCPA group) of serotonin level in females on the development of their offspring. The Control group demonstrated high developmental and phenotypic variability typical of killifish. We revealed several distinct developmental trajectories differing in rate and timing of ontogenetic events. These developmental differences resulted in extended in time hatching with a pronounced peak. Newly hatched larvae differed in the degree of yolk reduction and skeletal development. Pharmacological treatment of females led to heterochronies and decline in the developmental and phenotypic variability of their offspring. The HTP group displayed retarded early but accelerated and synchronized late stages of development. As the results, period of hatching was compressed. All newly hatched HTP larvae had an advanced skeleton state relative to the Control group. Embryogenesis of the PCPA group closely resembled that in the Control group. However, hatching dynamics was changed by changing the ratio of early and late hatching larvae. The obtained data indicate that female's serotonin level regulates the developmental trajectory of offspring and likely has an adaptive potential.

Keywords: heterochronies, developmental plasticity, killifish, *Fundulopanchax gardneri*

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЧНОГО РОСТА МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.) В УСЛОВИЯХ ЕГО ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

© 2022 г. Н. С. Шульгина^а, *, М. В. Кузнецова^а, Н. Н. Немова^а

^аИнститут биологии – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ

“Карельский научный центр Российской академии наук”, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: Shulgina28@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Исследовали влияние двух световых режимов – 16С:8Т (16 ч свет : 8 ч темнота) и круглосуточного (24 ч свет : 0 ч темнота), на темпы роста и уровень экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (*Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), тяжелой цепи миозина (*MyHC*) и паралога миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) в мышцах двухлеток атлантического лосося, выращенных в течение 3.5 месяцев (с июля по октябрь) в условиях рыбоводного завода. Контрольная группа состояла из двухлеток лосося, выращиваемых в бассейнах того же завода по стандартной технологии без дополнительного освещения. Несмотря на то, что на конец эксперимента достоверных различий по массе между исследуемыми группами рыб выявлено не было, дополнительное освещение положительно повлияло на продолжительность и интенсивность роста рыб в осенний период при снижении температуры воды. Уровни экспрессии генов *MyHC*, *MyoG*, паралога *MyoD1* и *MSTN1b* были достоверно выше у рыб из экспериментальных групп с дополнительным освещением по сравнению с таковыми у особей в контрольной группе в осенний период. Выявленные межгрупповые различия в одновременной экспрессии исследуемых генов указывают на различия в механизмах регуляции мышечного роста у рыб в зависимости от условий освещения. Установлены закономерности в сезонной динамике уровней экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, схожие для групп двухлеток лосося, содержащихся при разных условиях освещения.

Ключевые слова: атлантический лосось, экспрессия миогенных регуляторных факторов, рост, режимы фотопериода

DOI: 10.31857/S0475145022060088

ВВЕДЕНИЕ

Фотопериод является одним из важнейших абиотических факторов, определяющих рост и развитие многих видов живых организмов, в том числе и рыб. Под воздействием света у рыб происходят изменения в работе нейроэндокринной системы, что, в свою очередь, регулирует сроки наступления полового созревания и сезонный характер соматического роста. Так, было показано, что скорость процессов гиперплазии (увеличение количества) и гипертрофии (увеличение размера) мышечных волокон у атлантического лосося снижается в зимние месяцы, когда у рыб снижается аппетит из-за воздействия низких температур и коротких световых дней (Johnston et al., 2003, 2006). Напротив, использование непрерывного освещения в зимние месяцы при искусственном

выращивании атлантического лосося (*Salmo salar* L.) способствует ускорению темпов роста рыб (Nordgarden et al., 2003; Oppedal et al., 2003). В предыдущих исследованиях, проведенных нами на сеголетках и двухлетках атлантического лосося, содержащихся в условиях искусственного воспроизводства, было показано положительное воздействие круглосуточного освещения на темпы роста молоди рыб, что способствовало их более продолжительному росту в осенний период в отличие от особей из контрольных групп без дополнительного освещения (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Помимо стимуляции роста, многие исследования показали, что воздействие удлиненного фотопериода эффективно подавляет раннее половое созревание у лососевых (Guerrero-Tortolero, Bromage, 2008),

что широко используется в аквакультурном разведении лосося (Good et al., 2016).

Несмотря на обширные сведения о влиянии фотопериода на рост и репродуктивный статус рыб, на сегодняшний день не так много исследований, посвященных выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе пластичности роста, связанной с адаптацией к воздействию дополнительного освещения. Тем не менее, было высказано предположение, что сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и дифференцировку миогенных клеток-предшественников, ответственных за формирование мышечных волокон, чувствительны к воздействию факторов окружающей среды (Johnston et al., 2003). Так, в ряде работ было показано, что изменение таких факторов, как температура, питание и фотопериод, влияет на экспрессию генов, кодирующих белки – миогенные регуляторные факторы (МРФ), которые регулируют миогенез и рост мышц у рыб (Johnston, 2006; Chapalamadugu et al., 2009; Nagasawa et al., 2012). Результаты проведенных нами ранее исследований выявили вариации уровней экспрессии генов мышечных белков у разновозрастной молоди лосося связанные с воздействием на рыб дополнительного искусственного освещения разной продолжительности (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Было высказано предположение, что существуют различия в механизмах регуляции мышечного роста у рыб в зависимости от условий освещения.

Изменение экспрессии ряда генов миогенных регуляторных факторов, так называемых транскрипционных факторов регуляции миогенеза семейства bHLH – *MyoD*, *Myf5*, *миогенина (MyoG)* и *MRF4*, играет ключевую роль в процессе формирования и роста мышечных волокон на протяжении всего жизненного цикла рыб (Watabe, 2001). На начальных этапах миогенеза высокая экспрессия *MyoD* и *Myf5* активирует миобласты, что способствует их пролиферации и последующей гиперплазии мышечных клеток. Экспрессия *миогенина* и *MRF4* наиболее выражена на стадии дифференцировки миобластов и связана с гипертрофией мышечных волокон, когда мышечные трубки сливаются с образованием новых миофибрилл (Johansen, Overturf, 2005). Последовательная экспрессия миогенных регуляторных факторов приводит к экспрессии генов структурных мышечных белков, в том числе гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*). Тяжелая цепь миозина – важный функциональный и структурный домен молекулы наиболее распространенного мышечного белка миозина и, как следствие, экспрессия *MyHC* является одним из ключевых факторов, определяющих развитие скелетных мышц (Ahammad et al., 2019). Кроме того, в регуляции развития и роста мышечных волокон участвует член суперсемейства трансформирующих факторов роста β (*TGF β*) –

миостатин, который специфически продуцируется в скелетных мышцах и ингибирует пролиферацию и дифференцировку миобластов, в том числе за счет подавления экспрессии генов МРФ (Thomas et al., 2000; Østbye et al., 2007).

Изучение характера экспрессии вышеперечисленных генов в мышцах рыб, выращенных в условиях вариабельности внешних факторов – фотопериода и температуры среды, позволит охарактеризовать молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции мышечного роста рыб и, как следствие, их темпов роста, при адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Эти данные могут иметь значение для разработки научно-обоснованных подходов при использовании дополнительного освещения на рыбоводных заводах и предприятиях аквакультуры с целью улучшения роста и повышения жизнеспособности выращиваемой молоди атлантического лосося.

В связи с вышесказанным была проведена настоящая работа с целью оценить характер экспрессии генов, контролирующих развитие и рост мышц, и темпы роста у двухлеток атлантического лосося, содержащихся при воздействии искусственного освещения разной продолжительности – 16-ти часового и круглосуточного (24 часа), в условиях рыбоводного завода в летне-осенний период. Исследование было направлено на выявление изменений темпов роста и уровней экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (*Myf5*, *MyoG*, паралогов *MyoD1*: *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c*), паралогов *миостатина*: *MSTN1a* и *MSTN1b*, а также тяжелой цепи миозина (*MyHC*), у молоди лосося в зависимости от воздействия на рыб разных режимов освещения и сезонных колебаний условий выращивания (главным образом, температуры воды).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание эксперимента

Эксперимент по влиянию двух световых режимов – 16С:8Т (16 ч свет : 8 ч темнота) и круглосуточного 24С:0Т (24 ч свет : 0 ч темнота), на рост и экспрессию генов, регулирующих миогенез, у двухлеток (1+) атлантического лосося (*Salmo salar* L.), проводился на Выгском рыбоводном заводе (пос. Сосновец, Беломорский район, Россия, 64°25' с.ш. и 34°28' в.д.). Молодь лосося, содержащаяся на Выгском рыбзаводе, была искусственно выведена из икры, полученной от диких производителей, и подрошена до двухлетнего возраста, после чего был поставлен эксперимент. Продолжительность эксперимента составила 3.5 мес. – с 9 июля по 26 октября. Рыба содержалась в бассейнах размером 2 × 2 метра и объемом воды 720 л. Водоснабжение бассейнов было проточным с использованием воды, поступающей с Маткожнен-



Рис. 1. Температура воды в период с июля по октябрь.

ского водохранилища (река Нижний Выг) со скоростью потока 60 л мин^{-1} . В связи с этим исследование проводилось при естественной сезонной динамике температуры воды, которая является оптимальной для роста и развития молоди атлантического лосося. Колебания температуры за период исследования составили: в июле $14.8\text{--}19.9^\circ\text{C}$, в августе $18.2\text{--}13.8^\circ\text{C}$, в сентябре $13.8\text{--}9.8^\circ\text{C}$, в октябре $9.8\text{--}2.4^\circ\text{C}$ (рис. 1).

Для каждой группы рыб было отведено по два бассейна. Одна группа (№ 1) была контрольной — без дополнительного освещения. Рыбы в контрольной группе содержались в бассейнах при естественном освещении, поступающем из окон, в течение июля и первой половины августа, при этом интенсивность освещения у поверхности воды составляла 12 люкс днем и 2 люкс ночью. Со второй половины августа в цехе, где располагались бассейны, было включено освещение с 5-ти вечера до 8-ми ч утра на 1 мес. Лампы располагались по бокам на стенах здания. Интенсивность освещения на поверхности воды в центральной части бассейнов составляла 10 люкс днем и 8 люкс ночью. Затем, начиная с 10 сентября, свет был включен постоянно, при этом интенсивность освещения у поверхности воды была неравномерной, 8 люкс в центральной части бассейнов. Во второй группе (№ 2) соблюдался режим освещения $16\text{C}:8\text{T}$ (16 ч свет, 8 — темнота). Поддержание цикла свет-темнота в течение суток происходило автоматически с помощью розеток-таймеров (Feron TM-50). В третьей группе (№ 3) освещение было круглосуточным $24\text{C}:0\text{T}$ (24 ч). Экспери-

ментальные бассейны (группы 2 и 3) были оборудованы двумя светодиодными светильниками (Aquaelleddy smart LED sunny, 6W, 6500K), расположенными на стенках бассейнов по диагонали друг к другу, и накрыты черной, не пропускающей свет, пленкой. Интенсивность освещения составляла 760 люкс на поверхности воды под светодиодными светильниками и 400 люкс вокруг них, 45 люкс на противоположной стороне от светильников и 70 люкс в центральной части бассейна.

Все остальные условия содержания рыб во всех бассейнах каждой группы были одинаковыми: плотность посадки (≈ 1245 особей на бассейн), режим кормления и корм, профилактические меры и уход за бассейнами. Рыбу кормили коммерческим кормом Biomar Inicio 917 (Biomar, Дания) в соответствии с рекомендациями рыбоводного завода, которые зависели от колебаний температуры воды. Рыбу кормили с помощью автоматических кормушек в следующем режиме: каждые 20–30 с с 6-ти ч утра до 22 ч вечера в июле и августе, затем каждые 40–45 с с 9-ти ч утра до 18-ти ч вечера в сентябре и октябре.

В начале исследования рыбы в каждом бассейне (в количестве 160 особей/бассейн) были помечены с помощью чипов (Felixcan SL, Испания). Для этого рыбы были усыплены при помощи гвоздичного масла. После измерения массы и длины (по Смитту) тела, рыбе вводили чип с индивидуальным номером. Чипировали особей среднего размера в пределах массы 7–14 г. Средняя масса рыб, отобранных в начале эксперимента (9 июля), в каждом бассейне была одинаковой

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики особей атлантического лосося, взятых на молекулярно-генетический анализ

Дата	Режим освещения	<i>n</i> , шт	Средняя масса, г	Средняя длина (АС), см
09 июля	Контроль	7	10.21 ± 0.70	9.94 ± 0.17
	16С:8Т	7	10.04 ± 0.66	9.59 ± 0.18
	24С:0Т	7	10.10 ± 0.61	9.73 ± 0.22
08 августа	Контроль	8	20.75 ± 1.33	11.45 ± 0.26
	16С:8Т	8	17.60 ± 1.14	11.04 ± 0.19
	24С:0Т	8	19.46 ± 1.30	11.36 ± 0.21
05 сентября	Контроль	8	27.04 ± 1.45	13.06 ± 0.29
	16С:8Т	8	26.58 ± 2.17	13.03 ± 0.37
	24С:0Т	8	26.80 ± 1.94	13.08 ± 0.31
05 октября	Контроль	10	28.52 ± 2.02	13.69 ± 0.36
	16С:8Т	10	26.23 ± 1.25	13.05 ± 0.25
	24С:0Т	10	28.78 ± 1.88	13.83 ± 0.33
26 октября	Контроль	7	29.37 ± 2.87	13.74 ± 0.55
	16С:8Т	7	26.57 ± 2.40	13.90 ± 0.41
	24С:0Т	7	29.26 ± 2.48	13.74 ± 0.35

и составила 10.20 ± 0.13 г (группа 1 – контроль), 10.25 ± 0.15 г (группа 2 – 16С:8Т), 10.16 ± 0.15 г (группа 3 – 24С:0Т). Далее раз в месяц в день отбора проб (8 августа, 5 сентября, 5 октября, 26 октября) проводили замеры 30–40 чипированных рыб из каждой исследуемой группы. В дальнейшем эти данные использовали для расчета прироста массы и темпов роста рыб. Удельный темп роста определяли как $УТР (\% \cdot \text{день}^{-1}) = [(\ln \text{конечный вес} - \ln \text{начальный вес}) / n \text{ дней}] \times 100$.

Образцы эпаксиальных (белых) мышц для молекулярно-генетического анализа отбирали у рыб после измерения их массы и длины тела в начале эксперимента (9 июля) и затем каждый месяц (8 августа, 5 сентября, 5 октября, 26 октября). Образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до начала анализа. Размерно-весовые характеристики рыб, взятых на анализ, представлены в виде $M \pm SE$ в табл. 1.

Экспрессия исследуемых генов

Тотальная РНК была выделена из образцов эпаксиальных (белых) скелетных мышц рыб с использованием набора “RNA-extract”, аналога TRIzol (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя. Затем суммарную РНК обрабатывали ДНКазой (Силекс, Россия). Целостность и качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически при коэффициенте поглощения 260/280 нм (Nano-Photometer C40-Touch, Implen, Германия). РНК подвергали обратной транскрипции с использо-

ванием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексонуклеотидов (Евроген, Россия). В дальнейшем синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов определяли методом ПЦР-РВ (Зорина, 2012). Анализ проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США). Праймеры для гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*), референсного гена (фактора элонгации-1 (*Ef-1 α*)), генов миогенных регуляторных факторов (*миогенина* (*MyoG*), паралога *MyoD1* (*MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), *Myf5*), а также паралога *миостатина* (*MSTN1a* и *MSTN1b*), подбирали с помощью программы Nucleotide BLAST. Праймеры были синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 2. Амплификацию 2 мкл кДНК (разведение 1 : 5) проводили с использованием 5 мкл набора “5 \times Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I” (Евроген, Россия). Протокол ПЦР был следующим: денатурация ДНК в течение 5 минут при 95°C ; повторяющиеся циклы (42): денатурация ДНК в течение 20 с при 95°C , отжиг праймеров в течение 30 с при 60°C и элонгация ДНК в течение 30 с при 72°C . Каждый образец был загружен в трех повторностях на одной планшете. Специфичность реакции ПЦР и присутствие димеров праймеров проверяли по кривым плавления, полученным в соответствии с протоколом диссоциации от 65°C до 97°C . Стандартные кривые, соответствующие

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР-РВ

Ген	Последовательность 5'–3'	Размер ампликона, п.о.	Номер в GenBank
<i>EF-1a</i>	F: TTGCTGGTGGTGTGGTGAG R: AAACGCTTCTGGCTGTAGGG	154	AF321836.1
<i>MyoG</i>	F: GTGGAGATCCTGAGGAGTGCC R: CTCACCTCGACGACGAGACC	147	DQ452070
<i>MyoD1a</i>	F: TGGACTGCCTATCAAACATCC R: TCTCACTCGCTATGGAACC	123	AJ557148
<i>MyoD1b</i>	F: ATTTTCGTTCCCTGTCCACCTCTG R: ATGTGTTTCGTCTTCGTTGTAATGG	152	AJ557150
<i>MyoD1c</i>	F: ACGGCGAAAATACTACTACCCTTC R: TAGCTGCTTCGTCTTGCGGA	133	DQ366709.1
<i>Myf5</i>	F: ACGCCATCCAGTACATCGAG R: AGTCAACCATGCTGTCGGAG	132	DQ452070
<i>MyHC</i>	F: TCTCATCCATAGACGCCATC R: AGTTGACTGCCAAGAAGAGG	159	DN164736
<i>MSTN1a</i>	F: GATTACACGCCATCAAGTCC R: CTCATCCTTATTGTCATCTCC	159	AJ344158
<i>MSTN1b</i>	F: TCTGAGTTTTATGGTTGCTTTCGG R: TTGTGACTTGATGGCGTGTAATC	151	NM_001123634.1

Последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'–3'), п.о. – пары оснований; *EF-1a* – фактор элонгации 1a (референсный ген); *Myf5* – фактор миогенеза 5; *MyoD1* – фактор детерминации миообластов 1; *MyoG* – миогенин; *MyHC* – тяжелая цепь миозина; *MSTN* – миостатин.

пятикратной серии разведений смеси кДНК всех образцов, позволили рассчитать эффективность ПЦР. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов определяли методом порогового цикла (Ct) и нормализовали по уровню экспрессии референсного гена фактора элонгации (*Ef-1a*) с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Данные выражали в единицах относительной экспрессии мРНК исследуемого гена.

Полученные данные были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2010). Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилкса. Многофакторный дисперсионный анализ MANOVA был применен для оценки степени влияния факторов (дополнительного освещения и даты отбора проб) на уровни экспрессии исследуемых генов. Для сравнения выборок по исследуемым показателям использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, различия оценивали по критериям Манна–Уитни и Тьюки. Различия считали достоверными при $p < 0.05$ (Коросов, Горбач, 2007). Для изучения взаимосвязи между значениями экспрессии генов использовался корреляционный анализ Пирсона. Для изучения взаимосвязи между уровнем экспрессии генов и размерами особей, а также между уровнем экспрессии генов и

темпами роста рыб, использовался регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масса и темпы роста рыб

Согласно результатам проведенного исследования прирост по массе двухлеток лосося за июль–октябрь составил 19.7 ± 1.5 г в 1 группе (контроль), 17.6 ± 1.3 г во 2 группе (16С:8Т) и 18.2 ± 1.1 г в 3 группе (24С:0Т). На конец эксперимента достоверных отличий по массе особей между группами, выращенными в разных условиях освещения, установлено не было. Тем не менее, двухлетки лосося из контрольной группы (1), содержащиеся без дополнительного освещения, были больше по массе по сравнению с особями из двух других групп – с режимами освещения 16С:8Т (2) и 24С:0Т (3), в августе и начале сентября (рис. 2, $p < 0.05$) (частично данные опубликованы Nemova et al., 2020). Установленные различия между группами наблюдались также и по удельным темпам роста (УТР) в августе (рис. 3, $p < 0.05$). Кроме того, в начале эксперимента масса и темпы роста у рыб во 2 группе с режимом 16С:8Т были ниже в сравнении с таковыми у рыб из группы с круглосуточным освещением (3) ($p < 0.05$). Можно предположить, что относительно более низкие значения массы и УТР у рыб из групп с дополни-

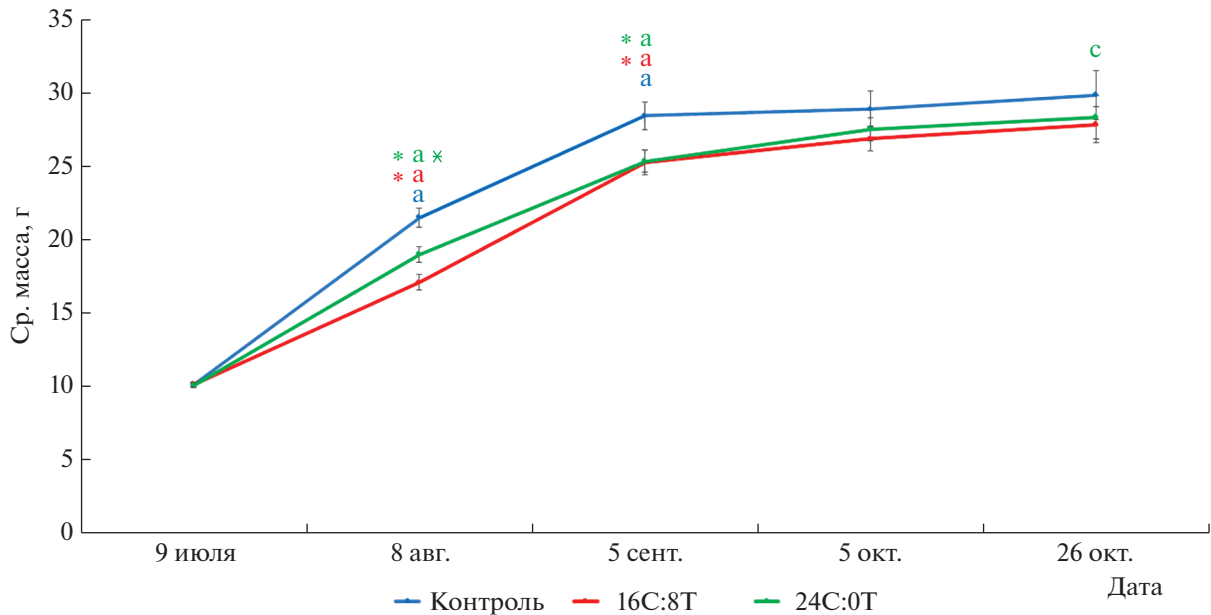


Рис. 2. Средняя масса двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения: Контроль (без дополнительного освещения), 16C:8T (16 ч/сут – свет, 8 ч/сут – темнота), 24C:0T (круглосуточное освещение 24/сут). * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), * – различия достоверны по сравнению с группой 2 с режимом освещения 16C:8T ($p < 0.05$), а – различия достоверны по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц ($p < 0.05$), с – различия в группе с постоянным освещением достоверны по сравнению с данными, полученными 5 сентября ($p < 0.05$).

тельным освещением в начале эксперимента связаны с реакцией на введение новых условий и необходимостью адаптации к ним. Ранее в исследованиях, проведенных на атлантическом лососе, было показано, что экспериментальное изменение условий фотопериода вызывает у рыб в начальный период своего воздействия стрессовую реакцию, в результате которой у них происходит снижение аппетита и темпов роста (Nordgarden et al., 2003; Oppedal et al., 2003). В работе, проведенной на молоди атлантической трески, которую содержали при постоянном освещении или в условиях естественного фотопериода, достоверные отличия по массе между группами были установлены только на 4-ый месяц исследования (Nagasawa et al., 2012), при этом масса у рыб из группы с постоянным освещением была больше на 13.3%. Вероятно, из-за периода адаптации рыб к новым световым условиям требуется более продолжительный период воздействия дополнительного освещения для проявления подобного стимулирующего роста эффекта. Необходимо отметить, что в аналогичном эксперименте, проведенном нами на сеголетках (0+) атлантического лосося, различия по массе рыб между контрольной группой и группой, содержащейся при постоянном освещении, в пользу последней, наблюдались уже в первый месяц исследования и сохранялись вплоть до конца экспериментального периода (Churova et al., 2020). Это указывает на возраст-

ные особенности пластичности роста рыб при их адаптации к новым условиям освещения. При сравнении результатов настоящей работы с данными нашего предыдущего исследования, проведенного на двухлетках лосося, которых содержали при круглосуточном освещении с мая, обращает на себя внимание то, что рыбы на всем протяжении эксперимента были больше по массе в отличие от особей из контрольной группы без дополнительного освещения (Shulgina et al., 2021). Вероятно, дополнительное освещение, включенное на два месяца раньше, нежели в настоящей работе, оказало более благоприятное воздействие на рост рыб, поскольку такое удлинение светового дня имитировало увеличение количества световых часов в весенне-летний период в естественной среде обитания лосося.

На протяжении периода исследования средняя масса рыб во всех трех группах достоверно повышалась вплоть до начала осени (5 сентября) ($p < 0.05$). В осенний период наблюдалось снижение темпов роста у рыб из всех исследуемых групп ($p < 0.05$). Тем не менее, в начале сентября рыбы из 2 группы по УТР достоверно превышали особей из двух других групп. У особей лосося из контрольной группы установлено наибольшее снижение темпов роста в течение сентября и октября в отличие от рыб из групп с дополнительным освещением, которые в этот период продолжали расти и достигли той же массы, что и рыбы из

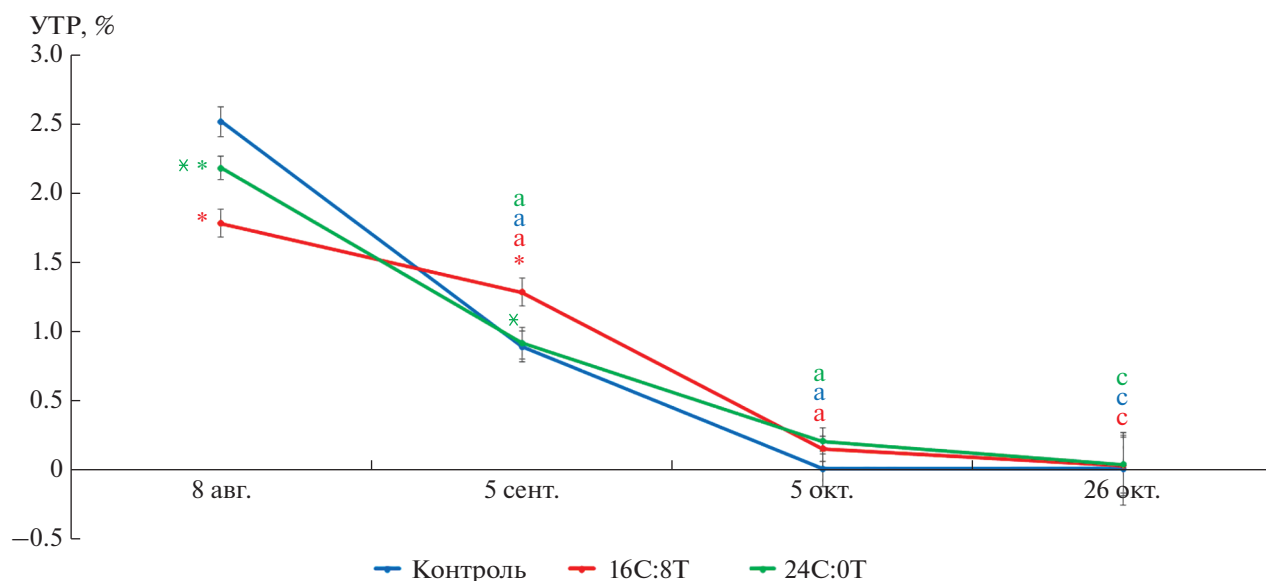


Рис. 3. Удельные темпы роста (УТР) (% день⁻¹) двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 2.

первой группы. При этом на конец эксперимента (спустя 3.5 мес.) средняя масса у особей в группе с постоянным освещением (3) была достоверно больше по сравнению с данными на начало сентября ($p < 0.05$). Полученные результаты можно объяснить с точки зрения влияния на рыб двух факторов. Замедление темпов роста двухлеток лосося в осенний период, вероятно, является результатом снижения аппетита у рыб, вызванного сезонным снижением температуры воды. В то же время различия по темпам роста между группами, а также наибольший прирост массы тела у особей из опытных групп (2 и 3) могут быть связаны с воздействием на рыб дополнительного освещения. Необходимо отметить, что подобные межгрупповые различия относительно прироста массы тела рыб к концу экспериментального периода на фоне замедления их темпов роста в осенний период были получены нами и в других исследованиях, проведенных на сеголетках и двухлетках атлантического лосося (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Как было показано ранее, искусственное увеличение продолжительности периода освещения позволяет продлить период активного питания рыб, а также влияет на нейроэндокринную систему, что стимулирует пищевое поведение и способствует расходованию поступающих ресурсов преимущественно на процессы роста (Handeland et al., 2003; Nordgarden et al., 2003). Экспериментальные исследования, проведенные на лососевых видах рыб, подтверждают стимулирующее рост воздействие как удлиненного фотопериода, так и постоянного режима освещения (Johnston et al., 2003; Noori et al., 2015).

Таким образом, в нашем исследовании дополнительное освещение в группах 2 и 3 повлияло на продолжительность роста рыб в осенний период при снижении температуры воды. Необходимо отметить, что искусственное освещение экспериментальных бассейнов не повлияло на смертность двухлеток лосося за исследуемый период (погибших рыб выявлено не было, также как и в контрольной группе).

Экспрессия генов

Межгрупповые отличия в уровнях экспрессии исследуемых генов. Согласно полученным данным уровни экспрессии всех исследуемых генов в мышцах молоди атлантического лосося имели сезонную динамику и изменялись на протяжении всего эксперимента. Наряду с этим уровни экспрессии генов тяжелой цепи миозина (*MyHC*), *MyoG* и *MyoD1b* менялись в зависимости от используемого режима освещения.

Достоверные различия в уровнях экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, между группами рыб, содержащимися в разных условиях освещения, были выявлены уже в первый месяц исследования (август). Так, у двухлеток лосося из группы с постоянным освещением (3) были выявлены достоверно более высокие уровни экспрессии гена *MyoG* по сравнению с таковыми у рыб в группе с режимом освещения 16C:8T (2) (рис. 4, $p < 0.05$), а также генов *MyoD1b* (рис. 5, $p < 0.05$) и *MyoD1a* (рис. 6, $p < 0.05$) по сравнению с таковыми у особей из контрольной группы (1). Высокие уровни экспрессии этих генов у молоди рыб могут быть связаны с интенсивно идущими процессами ги-

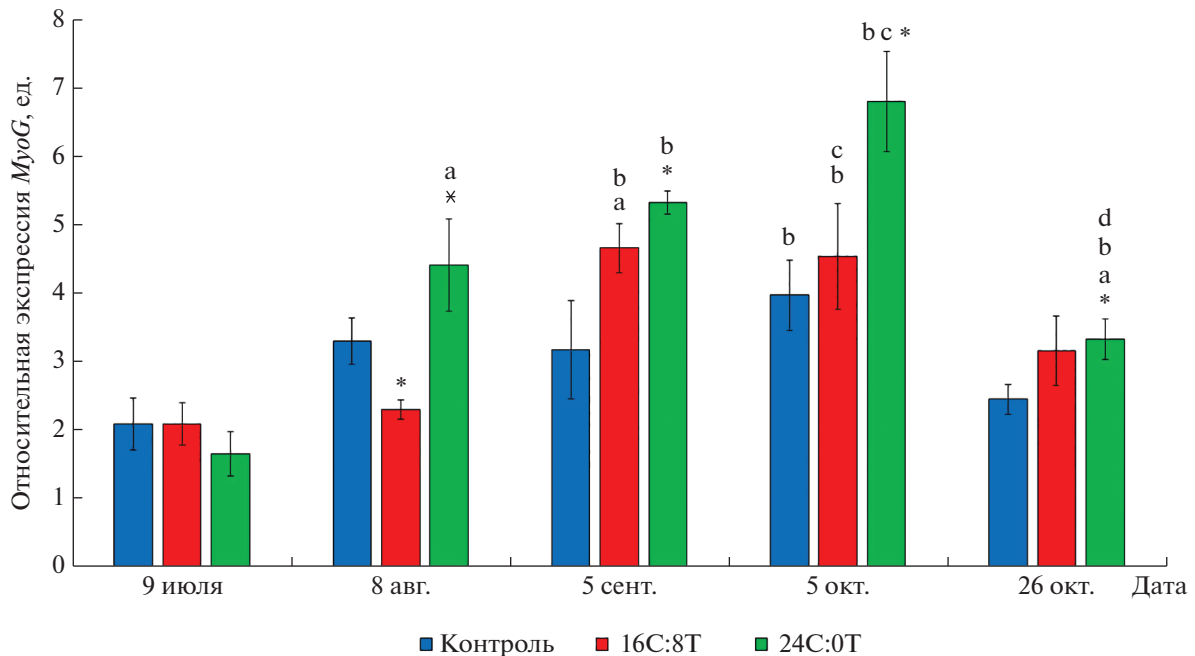


Рис. 4. Относительная экспрессия гена *MyoG* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения: Контроль (без дополнительного освещения), 16C:8T (16 ч/сут – свет, 8 ч/сут – темнота), 24C:0T (круглосуточное освещение 24 ч/сут). * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), * – различия достоверны по сравнению с группой 2 с режимом освещения 16C:8T ($p < 0.05$), a – различия достоверны по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц ($p < 0.05$), b – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 9 июля ($p < 0.05$), c – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 8 августа ($p < 0.05$), d – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 5 сентября ($p < 0.05$).

перплазии и гипертрофии мышечных волокон. Так, ранее было показано (Johansen, Overturf, 2005), что уровень экспрессии генов, регулирующих миогенез (*MyoD*, *Myf5*, *MyoG* и *Mrf4*), коррелирует с механизмами роста мышц во время развития радужной форели. При этом, на ранних стадиях мышечного роста увеличение уровней экспрессии *MyoD* и *Myf5* в недифференцированных миогенных клетках-предшественниках (МКП) напрямую связано с их интенсивной пролиферацией и последующей клеточной гиперплазией (образованием миотуб и их дифференцировкой в новые мышечные волокна). *MyoG* и *Mrf4* экспрессируются позже и связаны с терминальной дифференцировкой и слиянием миобластов с существующими миофибриллами в процессе гипертрофии мышечных волокон (увеличения числа ядер, способствующих синтезу дополнительных миофибрилл) (Johansen, Overturf, 2005). Экспрессия *MyoG* индуцирует выход МКП из клеточного цикла, удлинение миофибрилл, сборку саркомеров и образование функциональной сократительной мускулатуры, а отсутствие экспрессии гена этого МРФ, напротив, предотвращает слияние миоцитов и приводит к образованию одноядерных мышечных волокон, как было показано на эмбрионах и личинках данио рерио (*Danio rerio*) (Ganassi et al., 2018), а также в исследованиях на клеточных культурах

миобластов, полученных из мышц радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Rescan et al., 1995), атлантического лосося (*Salmo salar*) (Bower and Johnston, 2010) и дорады (*Sparus aurata*) (Codina et al., 2014). Межгрупповые различия в уровнях экспрессии МРФ, выявленные в нашей работе, согласуются с результатами исследования, в котором воздействие непрерывного освещения, в отличие от естественного режима фотопериода, способствовало увеличению экспрессии генов МРФ – *pac7*, *Myf5* и *MyoG* в мышцах молоди атлантической трески, сопровождающемуся усилением роста рыб (Nagasawa et al., 2012).

Установлены достоверные отличия по уровню экспрессии гена *MyoG* между группами 1 (контроль) и 2 (с режимом 16C:8T) в пользу контрольной в августе (рис. 4, $p < 0.05$). Как было показано ранее на эмбрионах и взрослых особях камбалы, сравнительно высокий уровень *MyoG* может свидетельствовать о том, что большинство мышечных клеток находится на стадии дифференцировки, а не пролиферации (Zhang et al., 2010). Поскольку уровень экспрессии мРНК *MyoG* положительно коррелировал с массой рыб во всех исследуемых группах (в период с июля по октябрь) (табл. 4, $p < 0.05$), можно предположить, что наиболее низкие значения экспрессии этого гена у особей лосося, выращенных в условиях режима 16C:8T, отражают более

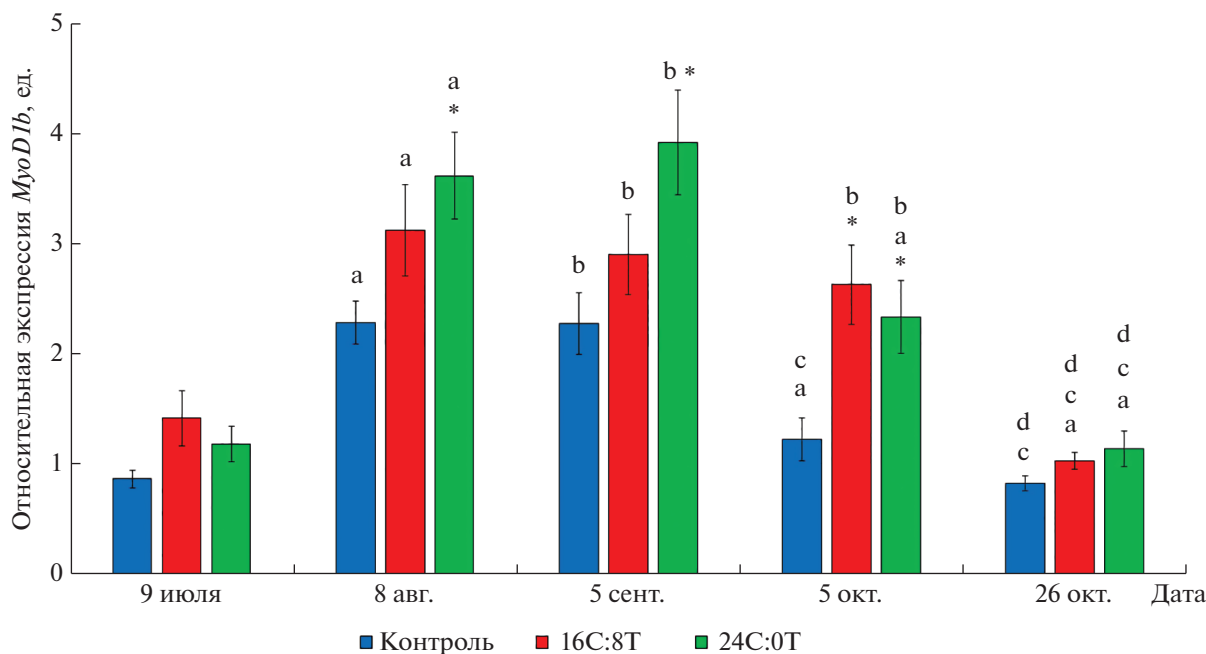


Рис. 5. Относительная экспрессия гена *MyoD1b* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

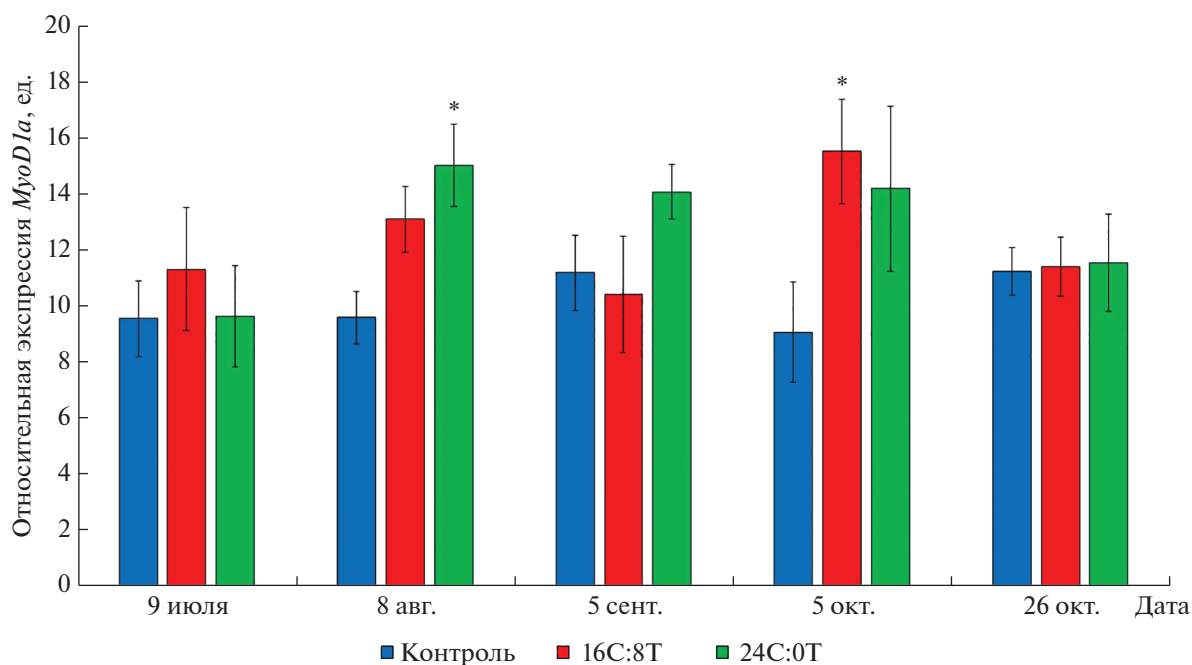


Рис. 6. Относительная экспрессия гена *MyoD1a* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

выраженное снижение прироста мышечной массы у этой группы рыб по сравнению с другими в начале эксперимента.

Таким образом, выявленные межгрупповые отличия в экспрессии исследуемых генов в мыш-

цах особей лосося в начале эксперимента указывают на различия в механизмах мышечного роста у рыб в зависимости от режима освещения. Необходимо отметить, что в опубликованных нами ранее исследованиях, проведенных на семголетках и

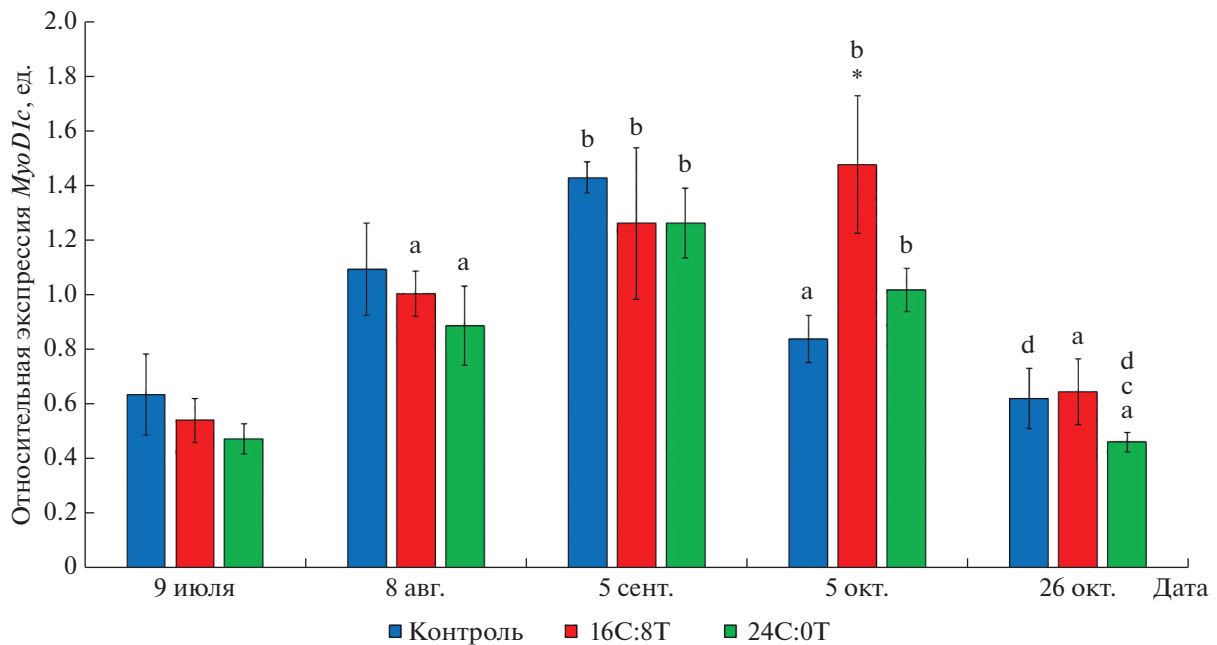


Рис. 7. Относительная экспрессия гена *MyoD1c* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

двухлетках атлантического лосося, также была показана зависимость уровней экспрессии генов *MyoG* и *MyoD1b* от используемого режима освещения (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021).

На протяжении эксперимента у двухлеток лосося, содержащихся при постоянном освещении (группа 3), наблюдались достоверно более высокие уровни экспрессии гена *MyoG* (в период с начала сентября и вплоть до конца эксперимента) (рис. 4, $p < 0.05$), а также гена *MyoD1b* (в начале сентября и октября) по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы (рис. 5, $p < 0.05$). Подобные различия по уровню экспрессии гена *MyoG* между группами с естественным режимом фотопериода и с постоянным освещением в пользу последней наблюдались на протяжении всего эксперимента (до 120 дней), проведенного на молоди атлантической трески, и сопровождались повышением темпов роста рыб (Nagasawa et al., 2012).

Уровни экспрессии мРНК паралога *MyoD1* – *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c* были выше у особей лосося в группе с режимом освещения 16C:8T (2) по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы в начале октября (рис. 5, 6, 7, $p < 0.05$). В исследовании на молоди паку (*Piaractus mesopotamicus*) было показано, что относительно более высокие уровни экспрессии гена *MyoD* могут быть связаны с преобладающим гиперпластическим механизмом роста мышц (Almeida et al., 2008). У лососевых в результате двухэтапной дупликации генома образовалось три функциональных

паралога гена *MyoD1*, которые отличаются друг от друга характером экспрессии в процессе развития рыб. Было высказано предположение, что *MyoD1c* возник в результате дупликации *MyoD1b* и эти гены в своей структуре имеют сходные регуляторные элементы (Macqueen, Johnston, 2006). На культурах клеток, выделенных из белых скелетных мышц атлантического лосося, было показано, что паралоги *MyoD* различаются на уровне регуляции транскрипции во время пролиферации и дифференцировки МКП. Так, экспрессируясь последовательно, гены *MyoD1c* и *MyoD1b* регулируют клеточный цикл миобластов, тогда как экспрессия *MyoD1a* сильно коррелирует с *MyoG* во время формирования миотуб, что говорит о том, что этот паралог участвует в терминальной дифференцировке мышечных клеток (Bower, Johnston, 2010).

Таким образом, установленные в нашей работе различия в уровнях экспрессии исследуемых МРФ в мышцах рыб из экспериментальных и контрольных бассейнов могут указывать на разное состояние мышечных клеток, формирующих новые волокна. Вероятно, относительно более высокие уровни экспрессии генов *MyoD1b* и *MyoG* у рыб из группы 3, а также паралога *MyoD1* в мышцах рыб из группы 2, свидетельствуют об интенсификации процессов пролиферации и дифференцировки мышечных клеток, что способствует росту мышц как посредством гиперпластического, так и гипертрофического механизмов.

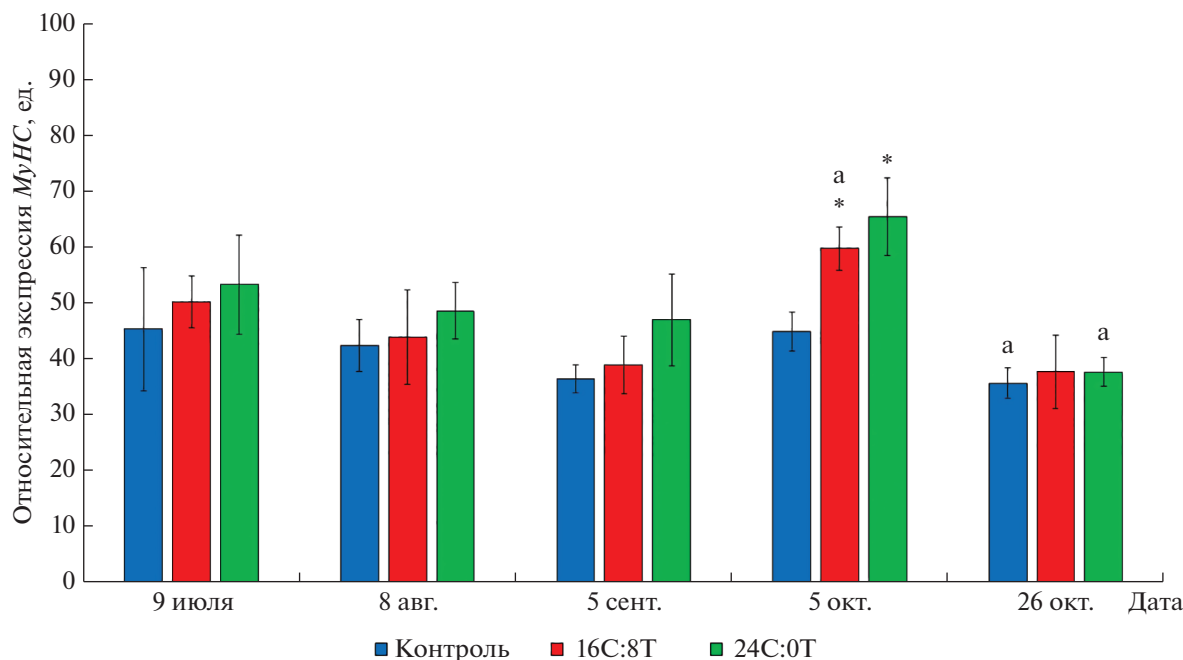


Рис. 8. Относительная экспрессия гена *MyHC* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

Уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) был выше ($p < 0.05$) в мышцах рыб из экспериментальных групп с дополнительным освещением (16C:8T и 24C) по сравнению с таковыми у особей из контрольной группы в начале октября (рис. 8, $p < 0.05$). Вероятно, эти различия вызваны более высокими уровнями экспрессии генов МРФ на протяжении эксперимента у двухлеток лосося в группах с дополнительным освещением по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы. Как было показано ранее, последовательная экспрессия миогенных регуляторных факторов приводит к экспрессии генов структурных мышечных белков, включая ген тяжелой цепи миозина (*MyHC*) (Ahammad et al., 2019). Повышенный уровень транскриптов генов *MyoG* и *Mrf4* на этапе дифференцировки миобластов в присутствии миотуб коррелировал с высокой экспрессией генов тяжелой цепи миозина и десмина в исследовании на культуре клеток мышц дорады *Sparus aurata* (Codina et al., 2014). Тяжелая цепь миозина является наиболее важным функциональным и структурным доменом молекулы миозина – основного мышечного белка, и, как следствие, ключевым определяющим фактором развития скелетных мышц (Ikeda et al., 2007). В другой работе было показано, что, когда скорость синтеза белка превышает скорость его деградации, это приводит к увеличению размеров мышечных волокон и, как следствие, к гипертрофическому росту мышц (Fuentes et al., 2013). Кроме того, уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина

(*MyHC*) является показателем, отражающим темпы прироста мышечной массы у рыб (Невроу et al., 2006; Чурова и др., 2015). В нашем исследовании, проведенном на сеголетках лосося, были установлены аналогичные различия в уровне экспрессии *MyHC* у особей из контрольной группы и группы с постоянным освещением, которые отражали различия по массе рыб (Churova et al., 2020). Кроме того, в предыдущей работе на двухлетках лосося нами была показана положительная взаимосвязь массы рыб с уровнем экспрессии гена тяжелой цепи миозина, который изменялся в зависимости от используемого режима освещения (Shulgina et al., 2021). Учитывая вышесказанное, полученные в настоящей работе результаты по уровню экспрессии гена *MyHC* могут указывать на то, что дополнительное освещение оказывает положительный эффект на прирост мышечной массы у двухлеток лосося и способствует более продолжительному росту в осенний период при снижении температуры воды, что согласуется с данными по массе рыб в этот период. Отсроченное увеличение массы тела, наблюдаемое у рыб из групп 2 и 3 в начале эксперимента, вероятно, отражает время, необходимое для гипертрофии мышечных волокон, образующихся после адаптации рыб к стрессовому воздействию дополнительного освещения. Подобная задержка ростостимулирующих эффектов непрерывного освещения была отмечена ранее у смолтов атлантического лосося (Johnston et al., 2003). Тем не менее, авторы этого исследования выявили, что непрерывное освеще-

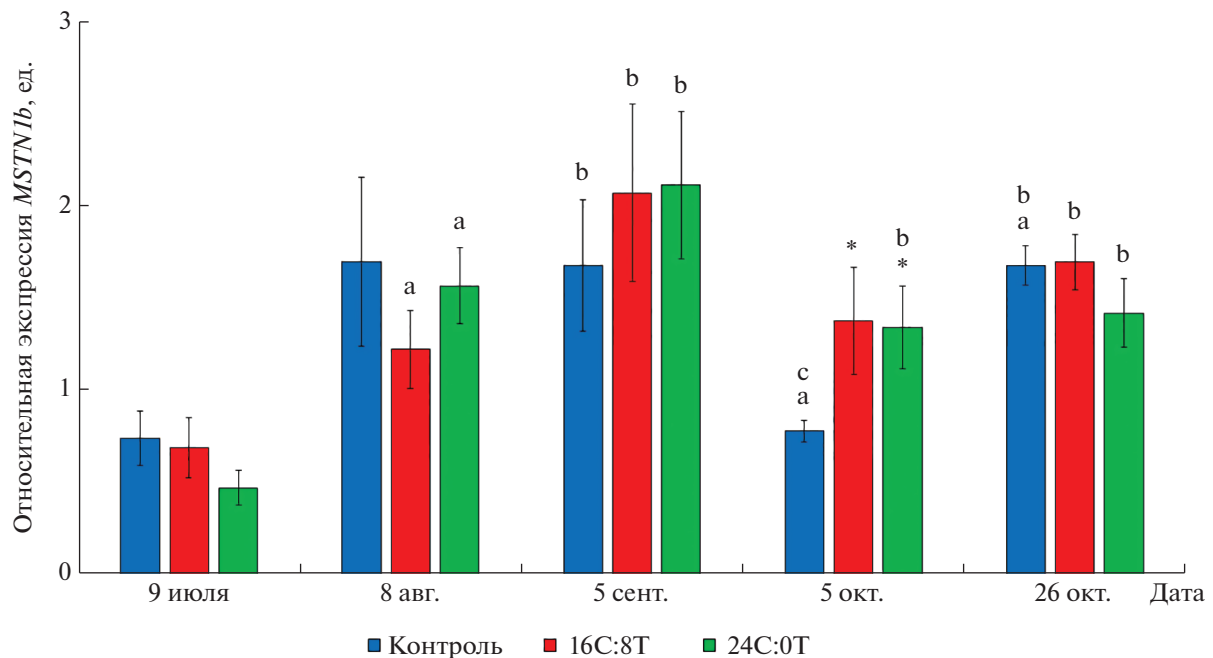


Рис. 9. Относительная экспрессия гена *MSTN1b* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

ние, в отличие от короткого светового дня, способствует увеличению числа делений МКП и/или уменьшению времени их клеточного цикла, что стимулирует их пролиферацию и впоследствии приводит к увеличению количества мышечных волокон лосося.

Наряду с установленными межгрупповыми различиями по уровню экспрессии гена *MyHC* в начале октября были выявлены относительно более высокие уровни экспрессии мРНК *MSTN1b* в группах 2 и 3 по сравнению с контрольной группой (рис. 9, $p < 0.05$), что, вероятно, связано с регуляцией роста мышц у рыб из экспериментальных групп в ответ на стимулирующее действие дополнительного освещения. Исследования *in vitro* показали, что миостатин подавляет развитие и рост скелетных мышц путем ингибирования пролиферации и дифференцировки миобластов и сателлитных клеток (Thomas et al., 2000). Частично это достигается за счет подавления экспрессии генов миогенных регуляторных факторов. Так, было показано, что специфические последовательности в промоторе гена *MSTN1b* связывают гомо- и гетеродимеры регуляторного фактора MyoD, необходимого для инициации программы миогенеза (Østbye et al., 2007). В другом исследовании, проведенном на молоди учанского леща (*Megalobrama amblycephala*), экспрессия *MSTN1a* и *MSTN1b* возросла в ответ на усиление дифференцировки и гипертрофии мышечных волокон, что, по мнению авторов, вероятно, связано с подавлением действия миогенина (Zhu et al., 2014). Таким

образом, в нашей работе повышенная экспрессия *MSTN1b* у рыб в группах с дополнительным освещением по сравнению с таковой у особей в контрольной группе, вероятно, связана с механизмами контроля мышечного роста, направленными на ослабление процессов их гиперплазии и гипертрофии. Это предположение согласуется с аналогичными результатами, полученными нами ранее для двухлеток лосося в другом эксперименте, где рыбы содержались при круглосуточном освещении более продолжительное время (Shulgina et al., 2021).

Динамика уровней экспрессии исследуемых генов. Согласно результатам, полученным в нашей работе, динамика экспрессии исследуемых генов у лосося имела сезонный характер. Так, на протяжении эксперимента уровни экспрессии генов *MyoD1b*, *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* возрастали у рыб из всех исследуемых групп и осенью были достоверно выше по сравнению с летним периодом (рис. 4, 5, 7, 9, 10, $p < 0.05$). При этом за период с 9 июля по 5 сентября была выявлена положительная корреляция между массой рыб и уровнями экспрессии генов *MyoD1b*, *MyoD1c* в контрольной группе, генов *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* в группе 2 (16C:8T), всех вышеуказанных генов в группе 3 (24C) (табл. 3, $p < 0.05$). За период с 9 июля по 5 октября положительная корреляция с массой была показана для уровней экспрессии генов *MyoD1c* и *MyoG* у рыб в контрольной группе, для уровней экспрессии генов *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* у рыб

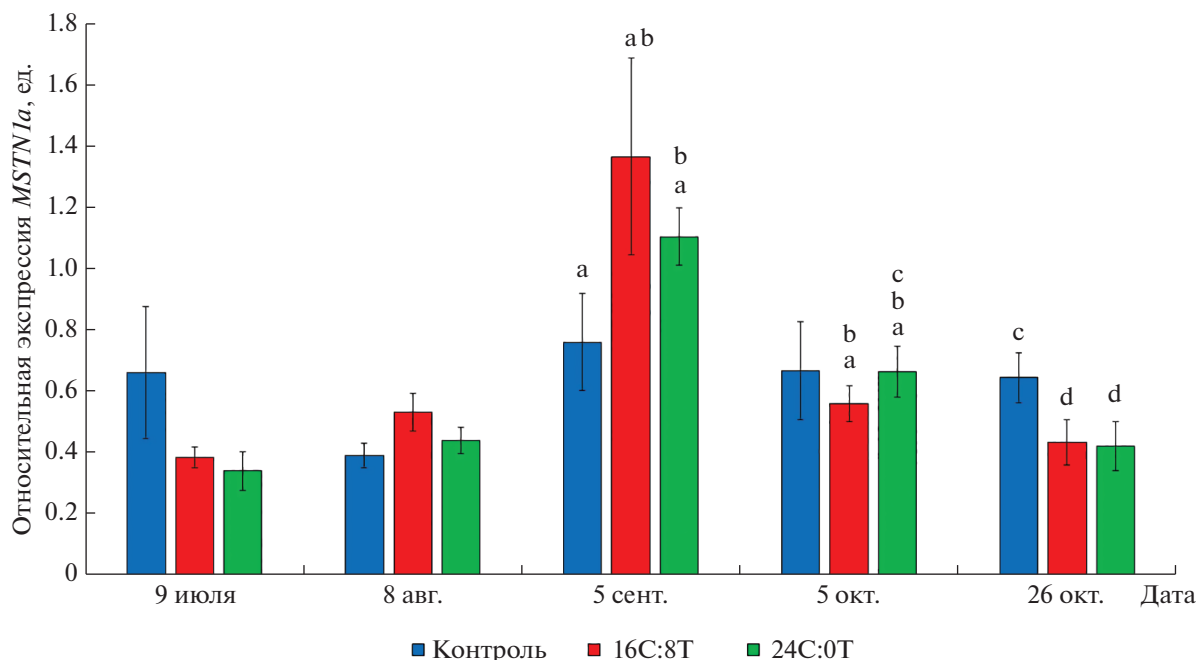


Рис. 10. Относительная экспрессия гена *MSTN1a* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

из группы 2, и для уровней экспрессии *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* у рыб из группы 3 (табл. 4, $p < 0.05$). Уровень экспрессии мРНК *Myf5* постепенно повышался у рыб в группах с дополнительным освещением и положительно коррелировал с их массой в период с 9 июля по 5 сентября (рис. 11, табл. 3, $p < 0.05$). Вероятно, такое повышение уровней экспрессии генов МРФ, а также паралогов миостатина, связано с усилением процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон и отражает прирост мышечной массы у молоди рыб в период их активного роста. Как известно, темпы роста и развития многих видов рыб, обитающих в умеренных широтах северных регионов, в том числе лососевых, подвержены воздействию сезонных колебаний температуры и фотопериода, в связи с чем в весенне-летний период наблюдается более быстрый рост, в отличие от осенне-зимнего (Danzmann et al., 2016). В нашем эксперименте температурный режим был естественным, и температура воды в бассейнах в период с начала июля и до начала сентября была значительно выше, нежели в осенний период. Ранее было показано, что повышение температуры воды способствует увеличению диаметра мышечных волокон, скорости пролиферации и интенсивности гиперплазии у молоди паку (*Piaractus mesopotamicus*) (de Paula et al., 2014). Более того, в исследованиях на других видах рыб была выявлена зависимость количества мРНК нескольких МРФ от температуры среды (Fernandes et al., 2006; Johnston et al., 2009). Так, у эмбрионов рыбы

фугу (*Takifugu rubripes*), инкубированных при более высоких температурах, наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена *MyoG* (Fernandes et al., 2006).

Напротив, при снижении температуры воды в период с начала сентября и вплоть до конца эксперимента у рыб во всех группах было зафиксировано снижение уровней экспрессии исследуемых генов. Так, в конце октября наблюдались достоверно более низкие значения экспрессии мРНК *MyHC* в группах 1 и 3 (рис. 8, $p < 0.05$), *MyoG* – в группе 3 (рис. 4, $p < 0.05$), *MSTN1a* – в группах 2 и 3 (рис. 10, $p < 0.05$), *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* – у рыб во всех исследуемых группах (рис. 5, 7, 11, $p < 0.05$). При этом у особей лосося во всех группах уровни экспрессии мРНК *MSTN1b* в конце октября достоверно превышали таковые в начале эксперимента (рис. 9, $p < 0.05$). В аналогичном эксперименте, проведенном нами на сеголетках (0+) атлантического лосося, было показано подобное одновременное снижение к концу исследования уровней экспрессии генов *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* и повышение экспрессии *MSTN1a* и *MSTN1b* во всех группах независимо от условий освещения (Churova et al., 2020). Кроме того, наблюдаемая динамика экспрессии генов *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* соответствует таковой, установленной нами для двухлеток лосося, которые содержались в группах с постоянным освещением и без дополнительного освещения в более продолжительном эксперименте (Shulgina et al., 2021). Полученные результаты согласуются

Таблица 3. Линейная регрессия и коэффициент корреляции между уровнями экспрессии генов МРФ, *MyHC* и паралогов *MSTN* в белых мышцах и массой двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, в период с июля по 5 сентября

Переменная (y)	Группа	Масса (x)	Коэффициент корреляции
<i>MyHC</i>	Контроль	$y = 47.50 - 0.35x$ $R^2 = 0.076$	-0.28
	16С:8Т	$y = 55.93 - 0.62x$ $R^2 = 0.103$	-0.32
	24С:0Т	$y = 54.03 - 0.24x$ $R^2 = 0.013$	-0.11
<i>MyoG</i>	Контроль	$y = 2.17 + 0.04x$ $R^2 = 0.096$	0.31
	16С:8Т	$y = 0.96 + 0.11x$ $R^2 = 0.474$	0.69*
	24С:0Т	$y = 0.71 + 0.16x$ $R^2 = 0.504$	0.71*
<i>Myf5</i>	Контроль	$y = 0.276 + 0.003x$ $R^2 = 0.033$	0.18
	16С:8Т	$y = 0.14 + 0.01x$ $R^2 = 0.373$	0.61*
	24С:0Т	$y = 0.08 + 0.01x$ $R^2 = 0.353$	0.59*
<i>MyoD1a</i>	Контроль	$y = 9.13 + 0.05x$ $R^2 = 0.026$	0.16
	16С:8Т	$y = 13.00 - 0.08x$ $R^2 = 0.041$	-0.20
	24С:0Т	$y = 11.63 + 0.08x$ $R^2 = 0.050$	0.22
<i>MyoD1b</i>	Контроль	$y = 0.43 + 0.07x$ $R^2 = 0.480$	0.69*
	16С:8Т	$y = 1.78 + 0.04x$ $R^2 = 0.077$	0.28
	24С:0Т	$y = 1.29 + 0.09x$ $R^2 = 0.227$	0.48*
<i>MyoD1c</i>	Контроль	$y = 0.28 + 0.04x$ $R^2 = 0.452$	0.67*
	16С:8Т	$y = 0.44 + 0.03x$ $R^2 = 0.207$	0.45*
	24С:0Т	$y = 0.21 + 0.04x$ $R^2 = 0.460$	0.68*
<i>MSTN1a</i>	Контроль	$y = 0.51 + 0.01x$ $R^2 = 0.017$	0.13
	16С:8Т	$y = -0.22 + 0.05x$ $R^2 = 0.558$	0.75*
	24С:0Т	$y = 0.05 + 0.03x$ $R^2 = 0.438$	0.66*
<i>MSTN1b</i>	Контроль	$y = 0.62 + 0.04x$ $R^2 = 0.154$	0.39
	16С:8Т	$y = -0.03 + 0.07x$ $R^2 = 0.517$	0.72*
	24С:0Т	$y = 0.10 + 0.07x$ $R^2 = 0.377$	0.61*

* – Достоверные корреляции при $p < 0.05$.

Таблица 4. Линейная регрессия и коэффициент корреляции между уровнями экспрессии генов *МРФ*, *MyHC* и паралога *MSTN* в белых мышцах и массой двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, в период с июля по 5 октября

Переменная (y)	Группа	Масса (x)	Коэффициент корреляции
<i>MyHC</i>	Контроль	$y = 45.77 - 0.16x$ $R^2 = 0.013$	-0.12
	16С:8Т	$y = 50.50 - 0.09x$ $R^2 = 0.002$	-0.05
	24С:0Т	$y = 49.22 + 0.18x$ $R^2 = 0.008$	0.09
<i>MyoG</i>	Контроль	$y = 1.80 + 0.06x$ $R^2 = 0.223$	0.47*
	16С:8Т	$y = 0.91 + 0.12x$ $R^2 = 0.362$	0.60*
	24С:0Т	$y = 0.49 + 0.19x$ $R^2 = 0.588$	0.77*
<i>Myf5</i>	Контроль	$y = 0.348 - 0.003x$ $R^2 = 0.048$	-0.22
	16С:8Т	$y = 0.208 + 0.004x$ $R^2 = 0.048$	0.22
	24С:0Т	$y = 0.168 + 0.004x$ $R^2 = 0.062$	0.23
<i>MyoD1a</i>	Контроль	$y = 8.14 + 0.07x$ $R^2 = 0.04$	0.20
	16С:8Т	$y = 13.31 - 0.03x$ $R^2 = 0.004$	-0.06
	24С:0Т	$y = 7.87 + 0.26x$ $R^2 = 0.229$	0.48*
<i>MyoD1b</i>	Контроль	$y = 1.01 + 0.03x$ $R^2 = 0.107$	0.33
	16С:8Т	$y = 1.76 + 0.04x$ $R^2 = 0.086$	0.29
	24С:0Т	$y = 1.94 + 0.04x$ $R^2 = 0.071$	0.27
<i>MyoD1c</i>	Контроль	$y = 0.53 + 0.02x$ $R^2 = 0.190$	0.44*
	16С:8Т	$y = 0.54 + 0.03x$ $R^2 = 0.144$	0.38
	24С:0Т	$y = 0.35 + 0.03x$ $R^2 = 0.367$	0.61*
<i>MSTN1a</i>	Контроль	$y = 0.554 + 0.003x$ $R^2 = 0.007$	0.08
	16С:8Т	$y = -0.03 + 0.04x$ $R^2 = 0.334$	0.58*
	24С:0Т	$y = 0.19 + 0.02x$ $R^2 = 0.292$	0.54*
<i>MSTN1b</i>	Контроль	$y = 0.96 + 0.01x$ $R^2 = 0.018$	0.14
	16С:8Т	$y = 0.29 + 0.05x$ $R^2 = 0.276$	0.53*
	24С:0Т	$y = 0.31 + 0.05x$ $R^2 = 0.295$	0.54*

* – Достоверные корреляции при $p < 0.05$.

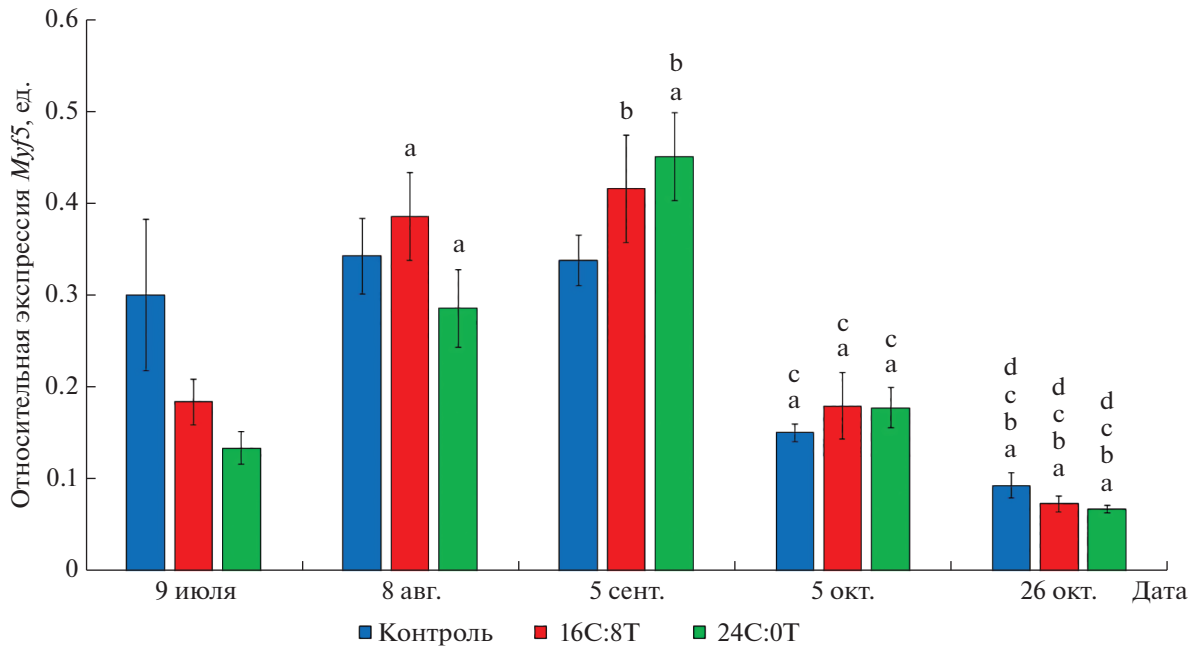


Рис. 11. Относительная экспрессия гена *Myf5* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

с данными исследования, в котором в мышцах морского леща спустя 30 дней голодания наблюдалась сниженная экспрессия генов *Myf5* и *MyoD2* и повышенная экспрессия *MSTN1*, что, по мнению авторов, указывает на снижение активации миобластов и мышечного роста (Codina et al., 2014). В другой работе, было показано, что продолжительное воздействие низкой температуры воды способствует повышению концентрации мРНК *MSTN* в мышцах канального сома (Weber, Bosworth, 2005). Необходимо отметить, что в нашей работе динамика уровней экспрессии паралога миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) была неодинаковой, что может указывать на различия в их функционировании в процессе миогенеза, однако их дифференциальную роль в регуляции этого процесса еще предстоит выяснить. Вероятно, наблюдаемые изменения уровней экспрессии исследуемых генов в конце эксперимента связаны с замедлением процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон у особей лосося при снижении их темпов роста в осенний период. Как было показано ранее в исследованиях на постсмолтах атлантического лосося, гиперплазия мышечных волокон заметно снижается по мере уменьшения температуры воды и продолжительности освещения в зимний период (Johnston et al., 2003). Было высказано предположение, что у рыб существует сезонный цикл формирования мышечных волокон, который накладывается на эндогенный ритм роста, зависящий от возраста и стадии жизненного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что двухлеткам атлантического лосося, которых выращивали в бассейнах с подключением дополнительного освещения, требуется период адаптации к новым световым условиям. При снижении темпов роста рыб в осенний период использование искусственного освещения оказало стимулирующий эффект на рост особей лосося из экспериментальных групп. Полученные в нашей работе данные указывают на то, что миогенные регуляторные факторы могут играть важную роль в регуляции формирования и роста мышц у молоди атлантического лосося в условиях вариабельности факторов окружающей среды. Межгрупповые различия в уровнях экспрессии генов МРФ, тяжелой цепи миозина и паралога миостатина могут отражать различия в регуляции процессов миогенеза у рыб в зависимости от условий освещения. Показано, что существуют определенные сезонные закономерности в одновременной экспрессии исследуемых генов у рыб, выращенных как в условиях дополнительного освещения, так и без него. Было высказано предположение, что это может отражать изменения интенсивности процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон, связанные с сезонными вариациями температуры окружающей среды. Представленные в настоящей работе данные совместно с опубликованными нами ранее результатами по исследуемой теме расширяют современные знания о молекулярных механизмах регуляции мы-

щечного роста, а также закономерностях раннего роста и развития у рыб при влиянии факторов среды.

В настоящее время результаты исследования используются при постановке экспериментов с подключением дополнительного освещения для стимуляции роста молоди атлантического лосося, который выращивается на рыбноводном хозяйстве в Северной Осетии-Алании (южный регион РФ, Ардонский район), что существенно дополнит представления о роли факторов среды в механизмах развития биохимических адаптаций у молоди лососевых рыб с учетом климатических, географических, экологических особенностей региона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность администрации и рыбводам Выгского рыбноводного завода за сотрудничество. Исследование было выполнено на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-14-00081 и № 19-14-00081П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.С. Шульгина – постановка и проведение эксперимента, сбор биоматериала, пробоподготовка и проведение лабораторного анализа образцов, анализ и статистическая обработка полученных данных, обсуждение результатов исследования, написание и подготовка публикации; М.В. Кузнецова – разработка, постановка и проведение эксперимента, сбор биоматериала, анализ полученных данных и обсуждение результатов исследования, подготовка публикации; Н.Н. Немова – руководитель проекта, обсуждение результатов исследования, подготовка публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). М., 2012. 80 с.

Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 2010. 104 с.

Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск, 2007. 75 с.

Чурова М.В., Мещерякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-генетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.), различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 304–312.

Ahammad A.S., Asaduzzaman M., Ceyhun S.B., Ceylan H., Asakawa S., Watabe S., Kinoshita S. Multiple transcription factors mediating the expressional regulation of myosin heavy chain gene involved in the indeterminate muscle growth of fish // Gene. 2019. V. 687. P. 308–318.

Almeida F.L.A., Carvalho R.F., Pinhal D., Padovani C.R., Martins C., Dal Pai-Silva M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases // Micron. 2008. V. 39. P. 1306–1311.

Bower N.I., Johnston I.A. Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2010. V. 298. № 6. P. R1615–R1626.

Chapalamadugu K.C., Robison B.D., Drew R.E., Powell M.S., Hill R.A., Amberg J.J., Murdoch G.K. Dietary carbohydrate level affects transcription factor expression that regulates skeletal muscle myogenesis in rainbow trout // Comparative Biochemistry and Physiology B. 2009. V. 153. № 1. P. 66–72.

Churova M.V., Shulgina N., Kuritsyn A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2020. V. 239. P. 110330.

Codina M., Capilla E., Jiménez-Amilburu V., Navarro I., Du S.J., Johnston I.A., Gutiérrez J. Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2014. V. 167. P. 90–99.

Danzmann R.G., Kocmarek A.L., Norman J.D., Rexroad C.E., Palti Y. Transcriptome profiling in fast versus slow-growing rainbow trout across seasonal gradients // BMC Genomics. 2016. V. 17. № 1. P. 60.

de Paula T.G., de Almeida F.L.A., Carani F.R., Vechetti-Júnior I.J., Padovani C.R., Salomão R.A.S., ... Dal-Pai-Silva M. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2014. V. 169. P. 31–37.

Fernandes J.M.O., Mackenzie M.G., Wright P.A., Steele S.L., Suzuki Y., Kinghorn J.R., Johnston I.A. Myogenin in model pufferfish species: Comparative genomic analysis and thermal plasticity of expression during early development // Comparative Biochemistry and Physiology

- Part D: Genomics and Proteomics. 2006. V. 1. № 1. P. 35–45.
- Fuentes E.N., Valdés J.A., Molina A., Björnsson B.T. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone–insulin-like growth factor system // *Gen. and Comp. Endocrinol.* 2013. V. 192. P. 136–148.
- Ganassi M., Badodi S., Ortuste Quiroga H.P., Zammit P.S., Hinits Y., Hughes S.M. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size // *Nature Communications.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–17.
- Good C., Davidson J. A review of factors influencing maturation of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with focus on water recirculation aquaculture system environments // *Journal of the World Aquaculture Society.* 2016. V. 47. № 5. P. 605–632.
- Guerrero-Tortolero D.A., Bromage N. Growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations with different grilse proportions under natural photoperiod and superimposed nighttime light // *Aquaculture.* 2008. V. 285. № 1. P. 63–66.
- Handeland S.O., Björnsson B.T., Arnesen A.M., Stefansson S.O. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of wild and farmed strain // *Aquaculture.* 2003. V. 220. P. 367–384.
- Hevroy E.M., Jordal A.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G.I., Olsvik P.A. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture.* 2006. V. 252. № 2–4. P. 453–461.
- Ikeda D., Ono Y., Snell P., Edwards Y.J., Elgar G., Watabe S. Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: evidence from comparative genomic analysis // *Physiol. Genomics.* 2007. V. 32. P. 1–15.
- Johansen K.A., Overturf K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Marine Biotechnology.* 2005. V. 7. № 6. P. 576–587.
- Johnston I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 2249–2264.
- Johnston I.A., Lee H.-T., Macqueen D.J., Paranthaman K., Kawashima C., Anwar A., Dalmay T. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: Genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes // *J. Experimental Biology.* 2009. V. 212. № 12. P. 1781–1793.
- Johnston I.A., Manthri S., Smart A., Campbell P., Nickell D., Alderson R. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation // *J. Experimental Biology.* 2003. V. 206. № 19. P. 3425–3435.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
- Macqueen D.J., Johnston I.A. A novel salmonid *myoD* gene is distinctly regulated during development and probably arose by duplication after the genome tetraploidization // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 21. P. 4996–5002.
- Nagasawa K., Giannetto A., Fernandes J.M.O. Photoperiod influences growth and mll (mixed-lineage leukaemia) expression in Atlantic cod // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e36908.
- Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Voronin V.P., Shulgina N.S., Churova M.V., Murzina S.A. The effect of the photoperiod on the fatty acid profile and weight in hatchery-reared underyearlings and yearlings of Atlantic salmon *Salmo salar* L. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 6. P. 845.
- Noori A., Mojazi Amiri B., Mirvaghefi A., Rafiee G., Kalvani Neitali B. Enhanced growth and retarded gonadal development of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following a long-day photoperiod // *Aquac. Res.* 2015. V. 46. № 10. P. 2398–2406.
- Nordgarden U., Oppedal F., Taranger G.L., Hemre G.I., Hansen T. Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I—Growth and feed conversion ratio // *Aquaculture Nutrition.* 2003. V. 9. № 5. P. 287–293.
- Oppedal F., Taranger G.L., Hansen T. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod // *Aquaculture.* 2003. V. 215. № 1–4. P. 145–162.
- Østbye T.K.K., Wetten O.F., Tooming-Klunderud A., Jakobsen K.S., Yafe A., Etzioni S., ... Andersen Ø. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2 // *Gene.* 2007. V. 403. № 1–2. P. 159–169.
- Rescan P.Y., Gauvry L., Paboeuf G. A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes // *FEBS Letters.* 1995. V. 362. № 1. P. 89–92.
- Shulgina N.S., Churova M.V., Murzina S.A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. The effect of continuous light on growth and muscle-specific gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) yearlings // *Life.* 2021. V. 11. № 4. P. 328.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation // *J. Biological Chemistry.* 2000. V. 275. № 51. P. 40235–40243.
- Watabe S. Myogenic regulatory factors // *Muscle Development and Growth* / Ed. Johnston I.A. San Diego: Academic Press, 2001. V. 18. P. 19–41.
- Weber T.E., Bosworth B.G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish // *Aquaculture.* 2005. V. 246. № 1–4. P. 483–492.
- Zhang Y., Tan X., Xu P., Sun W., Xu Y., Zhang P. Quantitative comparison of the expression of myogenic regulatory factors in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and adult tissues // *Chinese J. Oceanology and Limnology.* 2010. V. 28. № 2. P. 248–253.
- Zhu K., Wang H., Wang H., Gul Y., Yang M., Zeng C., Wang W. Characterization of muscle morphology and satellite cells, and expression of muscle-related genes in skeletal muscle of juvenile and adult *Megalobrama amblycephala* // *Micron.* 2014. V. 64. P. 66–75.

The Effect of Different Lighting Regimes on Some Molecular-Genetic Parameters of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Growth under Its Artificial Reproduction Conditions

N. S. Shulgina^{1, *}, M. V. Kuznetsova¹, and N. N. Nemova¹

¹*Institute of Biology – A Separate Subdivision of the FSBSI FRC “Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences”, ul. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

**e-mail: Shulgina28@yandex.ru*

We investigated the effect of two light regimes – 16L:8D (16 h light : 8 h dark) and continuous (24 h light : 0 h dark), on the growth rates and gene expression level of myogenic regulatory factors (*Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), myosin heavy chain (*MyHC*), and myostatin paralogs (*MSTN1a* and *MSTN1b*) in the muscles of Atlantic salmon yearlings reared for 3.5 months (from July to October) in the hatchery conditions. The control group consisted of salmon yearlings reared in the tanks of the same hatchery using standard technology without additional lighting. Despite the fact that there were no significant differences in weight between the studied fish groups at the end of the experiment, additional lighting had a positive effect on the duration and intensity of fish growth in the autumn period with a decrease in water temperature. The expression levels of the *MyHC*, *MyoG*, *MyoD1* and *MSTN1b* paralogs were significantly higher in fish from the experimental groups with additional lighting compared to those in the control group in autumn. The revealed intergroup differences in the simultaneous expression of the studied genes indicate differences in the mechanisms of muscle growth regulation in fish depending on the lighting conditions. Patterns were established in the seasonal dynamics of genes expression levels that regulate muscle growth, which are similar for salmon yearlings groups kept under different lighting conditions.

Keywords: Atlantic salmon, expression of myogenic regulatory factors, growth, photoperiod regimes

КРАТКОЕ
СООБЩЕНИЕ

УДК 591.3

**ПОВЕДЕНИЕ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СЕМЕННИК,
ЛИШЕННЫЙ КЛЕТОК СЕРТОЛИ**

© 2022 г. В. В. Мун^а, *, А. Ю. Кулибин^б, Е. А. Малолина^б

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

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

*e-mail: valeriy2125@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

Поддержание развития мужских половых клеток во многом зависит от целостности популяции клеток Сертоли (КС). Так как с наступлением половой зрелости КС большинства видов млекопитающих теряют способность к пролиферации и восстановлению своей популяции в случае повреждения, поиск альтернативных источников этих клеток пригодных для трансплантации – актуальная задача. Таким источником могут стать Сертоли-подобные клетки (СПК) сети семенника, экспрессирующие многие гены-маркеры КС и способные к пролиферации в культуре. Ранее мы уже показали способность СПК *in vitro* участвовать в образовании канальце-подобных структур при кокультивировании с КС мышонка. В настоящей работе мы протестировали свойства СПК *in vivo*. Для этого были проведены трансплантации СПК, размноженных в культуре, в семенники мышей, обработанные детергентом хлоридом бензалкония (ХБ), который был использован для удаления КС из семенников. Действительно, инъекции ХБ через сеть семенника снижали число КС. Также было продемонстрировано, что трансплантированные СПК заселяли пораженные семенные канальцы и формировали эпителиальные структуры на базальной мембране, сохраняя жизнеспособность, пролиферативную активность и экспрессию своих генов-маркеров в течение, как минимум, четырех недель.

Ключевые слова: Сертоли-подобные клетки, клетки Сертоли, хлорид бензалкония, сперматогенез, трансплантация

DOI: 10.31857/S0475145022060064

ВВЕДЕНИЕ

Сперматогенез – сложный и тонко-регулируемый процесс, в поддержании которого задействованы несколько популяций соматических клеток, однако в непосредственном контакте с половыми клетками находятся только клетки Сертоли (КС) (Hess, Franca, 2008). Они формируют основу сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев, где поддерживают развитие половых клеток, играя ведущую роль в гаметогенезе (Leblond, Clermont, 1952). Обширная функциональная активность КС приводит к высокой степени их дифференцировки и, как следствие, к ослаблению способности к их пролиферации. В результате этого популяция КС большинства видов млекопитающих не обновляется после наступления половой зрелости, а изолированные КС крайне плохо культивируются (Tarulli et al., 2012; Kulibin,

Malolina, 2016). Исключительная важность КС для поддержания сперматогенеза и невозможность восстановления их популяции в случае повреждения повышает интерес к поиску легко культивируемых аналогов КС.

Ранее нами было показано, что у мышей в сети семенника находится популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), активно пролиферирующих в культуре (Kulibin, Malolina, 2016). СПК экспрессируют многие гены-маркеры КС (Malolina, Kulibin, 2019), в том числе и транскрипционный фактор *Dmrt1*, играющий важную роль в поддержании функциональной активности КС (Matson et al., 2011).

Известно, что КС неполовозрелых животных способны заново формировать семенные канальцы *in vitro* (Yokonishi et al., 2013) и восстанавливать поврежденные семенные канальцы при транс-

плантации (Shinohara et al., 2003). В экспериментах *in vitro* было показано, что СПК участвуют в образовании новых семенных канальцев при культивировании с КС мышонка (Малоллина, Кулибин, 2017), однако их регенеративный потенциал *in vivo* еще не был изучен.

Поэтому целью этого исследования стала оценка поведения и свойств СПК мышей после их трансплантации в семенник, опустошенный от собственных КС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

В качестве доноров СПК использовали 2–5-месячных самцов мыши линии C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, экспрессирующих GFP под промотором β -актина. Реципиентами выступали 2–3-месячные самцы линии C57Bl/6. Мышей содержали в условиях вивария с режимом день/ночь 12 ч/12 ч, воду и корм животные получали *ad libitum*.

Получение и культивирование СПК

Суспензию СПК получали из фрагментов семенников, содержащих сеть семенника, по методике, описанной в работе (Кулибин, Малоллина, 2016). Кратко, ткань семенника последовательно инкубировали с растворами коллагеназы IV (3 мг/мл; Sigma) и ДНКазы I (0.1 мг/мл; Sigma), а затем трипсина (0.12%; Thermo Fisher) и ДНКазы I. Полученные клетки высаживали на культуральные планшеты, покрытые Matrigel (Corning), в концентрации 2×10^5 клеток/см² и культивировали 9 сут при 37°C и 5% CO₂ на среде DMEM/F12 с GlutaMAX (Gibco), содержащей пируват натрия (Sigma), инсулин/трансферрин/селенит (ITS, Thermo Fisher), пенициллин/стрептомицин (Пан-Эко) и 1% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher), а также Y-27632 (10 мкМ; Abcam), A-83-01 (0.5 мкМ; Sigma) и CHIR99021 (3 мкМ; Sigma). Смену среды проводили каждые 2 сут.

Опустошение семенников мышей-реципиентов от КС

Для повреждения популяции собственных КС, мышам-реципиентам в семенные канальцы вводили физиологический раствор, содержащий катионный детергент хлорид бензалкония (ХБ, Sigma). Тестировали две концентрации ХБ: 0.02 и 0.1%. Мышей анестезировали изофлураном, делали разрез в брюшине, извлекали семенники и через выводной проток семенника в сеть семенника вводили стеклянный микрокапилляр толщиной 100 мкм. При помощи механического микроинъектора вводили 20 мкл раствора ХБ, подкрашенного бромфеноловым синим (1 : 100). В качестве контроля аналогичным способом вводили физиологический раствор.

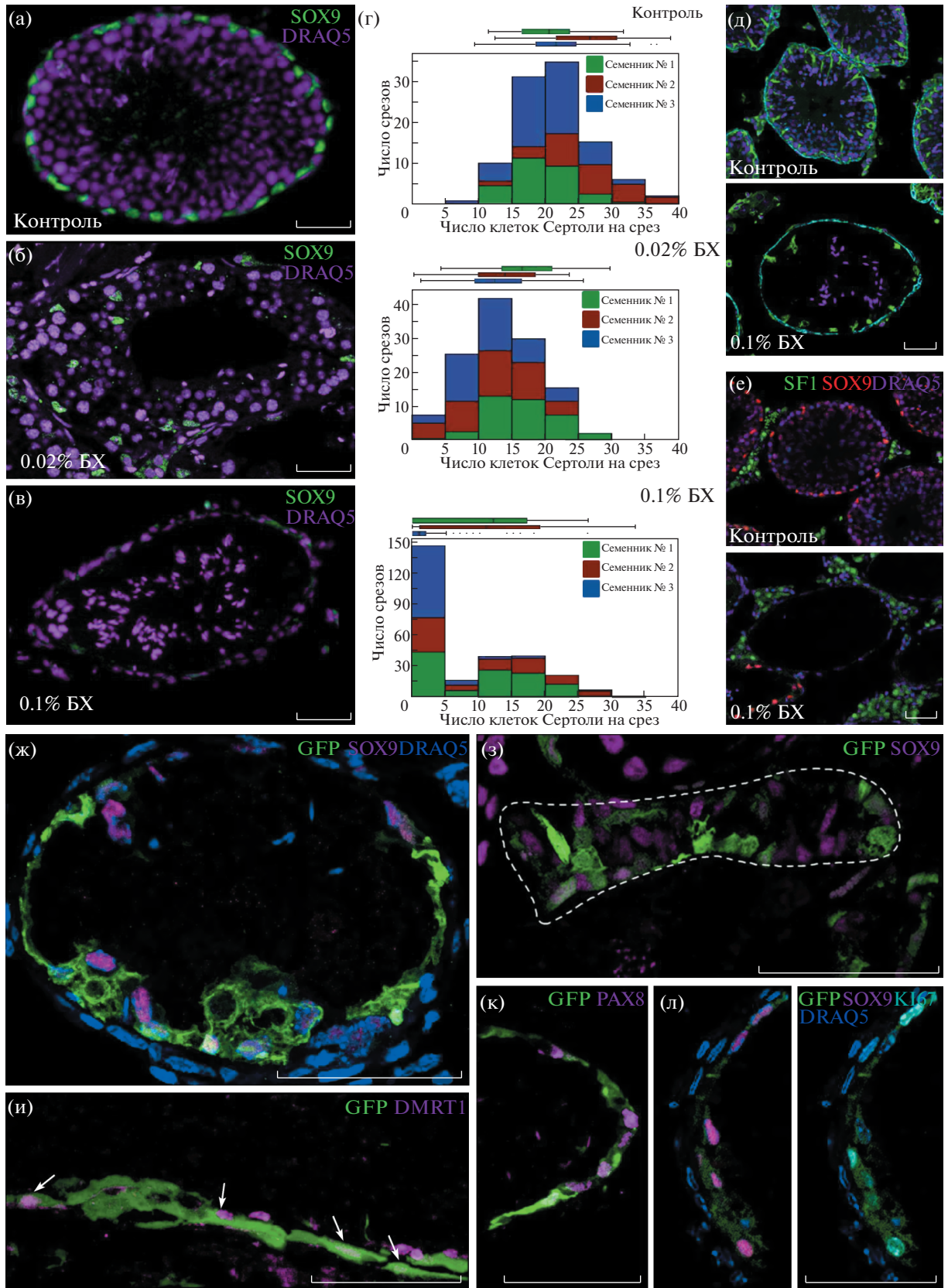
Трансплантация культуры СПК

На 4 сут после инъекции ХБ в семенники мышей-реципиентов по методике, описанной выше, в семенные канальцы вводили по 20 мкл суспензии, содержащей 8×10^5 клеток культуры СПК.

Иммунофлуоресцентная окраска семенников

Образцы фиксировали 24 ч в 10%-ном забуференном формалине, обезвоживали, заключали в парафин и готовили срезы толщиной 4 мкм. Срезы депарафинировали, восстанавливали антигены кипячением в цитратном буфере и обрабатывали блокирующим раствором с 2% бычьим сывороточным альбумином. Далее срезы инкубировали с первичными антителами 1 ч при 37°C и после отмывания — со вторичными, 30 мин при 37°C. Использовали первичные антитела против SOX9 (Millipore, AB5535, 1 : 200), GFP (Abcam, ab13970, 1 : 400), PAX8 (Abcam, ab97477, 1 : 100), KI67 (Invitrogen, SolA15, 1 : 200), SF1 (Thermo Fisher, N1665, 1 : 50), ACTA2 (Abcam, ab5694, 1 : 100), VIM (Abcam, ab24525, 1 : 200), DMRT1 (Santa Cruz, sc377167, 1 : 50), и соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor-488, 555, 594, 647 (Thermo Fisher, 1 : 500). Окраску мышечными антителами против DMRT1 осуществляли при помощи M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Labs,

Рис. 1. Результаты воздействия ХБ на клетки семенника (а–е) на 4 сут после инъекции и результаты трансплантации СПК (ж–л). (а–в) репрезентативные фотографии извитых канальцев контрольных (а) и обработанных 0.02% (б) и 0.1% (в) ХБ семенников, окрашенных на SOX9. (г) диаграммы распределения числа КС на срез семенного канальца в контрольных образцах и после обработки 0.02% и 0.1% ХБ, в верхней части представлены диаграммы размаха. (д) репрезентативные фотографии извитых канальцев, окрашенных на ACTA2 (маркер ПМК) и VIM (маркер КС). (е) иммунофлуоресцентное окрашивание семенников на SF1 (маркер клеток Лейдига). (ж–л) репрезентативные фотографии срезов семенников мышей-реципиентов после трансплантации культуры СПК (зеленая окраска — трансплантированные клетки). (ж) СПК на базальной мембране канальцев мышей-реципиентов (14 сут). (з) канальце-подобная структура, образованная СПК в интерстициальной ткани (пунктир, 14 сут); (и) окраска на DMRT1 (стрелки — DMRT1⁺ СПК). (к) окраска на PAX8. (л) окраска на SOX9 и KI67. Масштабный отрезок 50 мкм.



FMK-2201). Срезы фотографировали на микроскопе Leica TCS SP5 (Германия), и Zeiss LSM 880 Airyscan (Германия).

Количественный анализ

Для количественной оценки влияния ХБ на КС делали серийные срезы семенников толщиной 4 мкм через каждые 100 мкм и подсчитывали число КС на поперечных срезах семенных канальцев (не менее 245 срезов на группу). Результаты представлены в виде гистограмм. Количественные данные представлены в виде: среднее \pm стандартная ошибка среднего. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Сравнение количественных показателей выполняли с использованием одно-стороннего *U*-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе первого этапа работы на гистологических срезах семенников проводили визуальный анализ действия ХБ на ткань семенника. Было установлено, что на 4 сут после инъекции детергента в части канальцев происходит гибель половых клеток и КС, что приводит к снижению толщины сперматогенного эпителия по сравнению с контролем (рис. 1а, 1б) и заполнению просветов канальцев дебрисом (рис. 1в). Доля пораженных канальцев зависела от концентрации раствора. Так, после введения 0.02% ХБ наблюдались единичные нарушения, а после 0.1% происходило поражение порядка половины канальцев. В семенниках контрольной группы нарушений в структуре сперматогенного эпителия обнаружено не было. На 7 сут после инъекции ХБ гистологическая картина нарушений сперматогенной ткани не изменялась по сравнению с 4 сут.

Количественную оценку эффективности удаления КС проводили путем подсчета числа КС на поперечный срез канальца семенника на 4 сут. КС детектировали по окраске на маркер SOX9. Влияние ХБ на появление канальцев с малым числом КС оценивали по первой четверти полученных распределений. В контрольных образцах это значение равнялось 18.3 ± 0.1 КС на каналец (рис. 1а, 1г). Инъекция 0.02%-ного раствора ХБ привела к статистически достоверному ($P \leq 0.05$) снижению показателя по сравнению с контролем до 10.6 ± 0.1 (рис. 1б, 1г), при этом появилось 3 “пустых канальца” (меньше 3 КС) из 245 проанализированных. Введение 0.1% раствора ХБ привело к снижению первой четверти до 0.3 ± 0.03 (рис. 1в, 1г), что статистически отличается ($P \leq 0.05$) как от контроля, так и от меньшей дозы. Число

“пустых канальцев” равнялось 210 из 456 проанализированных (рис. 1г).

Несмотря на сильное воздействие 0.1%-ного раствора ХБ на число КС, его влияние на остальные популяции соматических клеток семенника не столь значительно. Так в канальцах с полностью разрушенным сперматогенным эпителием, где присутствовали лишь единичные КС, слой ПМК, окружающих семенные канальцы снаружи, не разрушался, ярко окрашивался на маркер АСТА2 и сохранял свою форму, что соответствует картине, наблюдаемой в контрольных образцах (рис. 1д). Окраска на SF1, который в семенниках половозрелых мышей высоко экспрессируется в клетках Лейдига, показала, что вокруг пораженных канальцев, так же, как и вокруг канальцев в контрольном семеннике, сохранялись группы этих клеток (рис. 1е).

Наши результаты согласуются с данными коллег (Yokonishi et al., 2020), впервые описавшими воздействие ХБ на сперматогенную ткань мышей, но в отличие от предыдущей работы, в нашем случае значительная гибель КС происходила при введении большей концентрации детергента (0.1 против 0.02%). Эти различия, вероятно, могут быть связаны с использованием разных производителей ХБ реагента. Механизм действия ХБ на эукариотические клетки изучен достаточно фрагментарно, однако на примере прокариот показано, что клетки с отрицательным зарядом подвержены большему влиянию со стороны детергента (Nagai et al., 2003). Эти данные подтверждаются и селективной активностью по отношению к нейронам толстой кишки крысы (Pan et al., 2011). В нашем случае, гибель КС скорее всего вызвана действием ХБ, в то время как гибель половых клеток опосредована снижением числа поддерживающих их развитие КС.

Исходя из всех вышеперечисленных данных, 0.1% раствор ХБ наиболее подходящий для подготовки семенников к трансплантации СПК. Введение клеток производили на 4 сут после инъекции детергента, а анализ результатов трансплантации – на 4, 14 и 28 сут. На всех сроках в семенниках реципиентов были найдены GFP⁺ клетки донора, причем, преимущественно, в полностью опустошенных канальцах. СПК, идентифицированные по двойной окраске на GFP и SOX9, в одиночку или группами заселяли пораженные семенные канальцы, и, распластавшись по базальной мембране, формировали похожие на эпителий структуры (рис. 1ж). Подобные структуры возникали уже на 4 сут после трансплантации и присутствовали на всех сроках фиксации. Часть СПК, попавшая в интерстициаль-

ную ткань, образовывала там канальце-подобные структуры (рис. 1з). Так как из-за особенностей выделения в культурах СПК присутствует примесь ПМК, мы проанализировали клеточный состав трансплантатов. Доля СПК на 4, 14, 28 сут составила соответственно 48 ± 13.9 , 56 ± 15 , $67 \pm 17.3\%$. Трансплантированные СПК экспрессировали PAX8 (рис. 1к), транскрипционный фактор – маркер клеток сети семенника (Malolina, Kulibin, 2019), и только часть из них экспрессировала маркер КС – DMRT1 (рис. 1и). Судя по положительной окраске на KI67 (рис. 1л), многие СПК остаются в клеточном цикле даже на 28 сут после трансплантации.

В итоге, можно сделать выводы, что донорские СПК сохраняют жизнеспособность в семенниках реципиента по крайней мере в течение месяца. Они преимущественно заселяют разрушенные участки канальцев реципиентов, располагаясь на места погибших КС, и формируют эпителиальные структуры. СПК сохраняют экспрессию маркера сети семенника – PAX8 и продолжают пролиферировать, как и в условиях культуры. Окраска части СПК на DMRT1, экспрессия которого необходима КС для поддержания развития половых клеток, делает целесообразным проведение в будущем совместных трансплантаций СПК со сперматогонияльными стволовыми клетками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН за использование оборудования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках ГЗ ИБР РАН № 0088-2021-0009.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с нормами, изложенными в “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и в “Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных” Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.В. Мун выполнил всю экспериментальную работу и написал основной текст статьи. А.Ю. Кулибин, Е.А. Малолина разработали протокол эксперимента, участвовали в получении материала, в написании и редакции текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Изучение области сети семенника и прилегающих к ней семенных канальцев в постэмбриональном развитии мыши // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 6. С. 450–458.
- Hess R., Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. V. 636. P. 1–15.
- Kulibin A. Y., Malolina E. A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture // Reproduction. 2016. V. 152. № 4. P. 271–281.
- Leblond C., Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1952. V. 55. № 4. P. 548–573.
- Malolina E. A., Kulibin A. Y. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1 // Reproduction. 2019. V. 158. № 5. P. 399–413.
- Matson C., Murphy M., Sarver A. et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis // Nature. 2011. V. 476. № 7358. P. 101–104.
- Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulos I. Benzalkonium Chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. № 13. P. e00377-19.
- Nagai K., Murata T., Ohta S. et al. Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain // Microbiol. Immunol. 2003. V. 47. № 10. P. 709–715.
- Pan W., Zheng B., Gao Y. et al. Transplantation of neonatal gut neural crest progenitors reconstructs ganglionic function in benzalkonium chloride-treated homogenic rat colon // J. Surgical Res. 2011. V. 167. № 2. P. 221–230.
- Shinohara T., Orwig K., Avarbock M. et al. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 3. P. 1064–1071.
- Tarulli G., Stanton P., Meachem S. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // Biol. Reprod. 2012. V. 87. № 1. P. 1–11.
- Yokonishi T., McKey J., Ide S. et al. Sertoli cell ablation and replacement of the spermatogonial niche in mouse // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 40.
- Yokonishi T., Sato T., Katagiri K. et al. In vitro reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation // Biol. Reprod. 2013. V. 89. № 1. P. 15.

The Behavior of Sertoli-Like Cells when Transplanted into Sertoli Cell-Depleted Testes

V. V. Mun^{1,*}, A. Yu. Kulibin², and E. A. Malolina²

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: valeriy2125@gmail.com*

The intact population of Sertoli cells is crucial for the maintenance of male germ cell development. At sexual maturity, Sertoli cells of most mammals lose their ability to proliferate and to restore their population after damage. So, a search for alternative sources of Sertoli cells suitable for transplantation is an important goal. Sertoli-like cells (SLCs) from the adult rete testis might become such a source because they express many Sertoli cell marker genes but are capable of proliferation *in vitro*. We have already shown earlier that SLCs participated in the formation of tubule-like structures when they co-cultured with neonatal Sertoli cells. In the current study, we tested SLC properties *in vivo*. We carried out transplantations of cultured SLCs into mouse testes treated with a detergent benzalkonium chloride (BC), which was used for depleting Sertoli cells from testes earlier. Indeed, BC injections via the rete testis reduced the number of Sertoli cells. It was also demonstrated that donor SLCs settled in at basement membranes of damaged host seminiferous tubules and form epithelial structures. They retain their viability, proliferative capacity and expression of marker genes for at least four weeks.

Keywords: Sertoli-like cells, Sertoli cells, benzalkonium chloride, spermatogenesis, transplantation