СОДЕРЖАНИЕ

Том 52, номер 6, 2021

ОБЗОРЫ

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

Contents

Vol. 52, No. 6, 2021

REVIEWS

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 397–418

ОБЗОРЫ

УДК 575.21

ПАРАДОКСЫ ЭПИГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ

Т. А. Ежова*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

**e-mail: ezhova2001@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.06.2021 г.
После доработки 27.06.2021 г.
Принята к публикации 04.07.2021 г.

Растения обладают уникальной способностью приспосабливать онтогенез к изменяющимся условиям среды и воздействию стрессовых факторов. Эта способность основана на существовании у растений двух особенностей эпигенетической регуляции, которые на первый взгляд выглядят взаимоисключающими. С одной стороны, растения способны к частичному эпигенетическому перепрограммированию генома, что может приводить к адаптации физиологии и метаболизма к изменившимся условиям среды, а также к изменению программ онтогенеза. С другой стороны, растения могут проявлять удивительную стабильность эпигенетических модификаций и способность передавать их вегетативным и половым поколениям. Сочетание этих неразрывно связанных между собой особенностей эпигенетики не только обеспечивает выживаемость в условиях прикрепленного/неподвижного образа жизни, но и лежит в основе удивительно широкого морфологического разнообразия растений, которое может приводить к появлению морф внутри одной популяции и существованию межпопуляционных морфологических различий. В обзоре обсуждаются молекулярно-генетические механизмы, которые обуславливают парадоксальное сочетание свойств стабильности и лабильности эпигенетических модификаций и лежат в основе поливариантности онтогенеза. Рассматриваются также существующие подходы для изучения роли эпигенетической регуляции в проявлении поливариантности онтогенеза, обсуждаются их ограничения и перспективы.

Ключевые слова: эпигенетика растений, поливариантность развития, молекулярные механизмы пластичности онтогенеза

DOI: 10.31857/S0475145021060045

ВВЕДЕНИЕ

В 2022 г. исполняется 150 лет со дня рождения Николая Константиновича Кольцова – предтечи многих основополагающих открытий и научных направлений XX века, включая эпигенетику (Morange, 2011; Раменский, 2018). Среди предсказаний великого ученого есть не только рассуждения об эпигенетических явлениях, но и идея о влиянии метилирования на проявление наследственных признаков. В 1915 г. он утверждал, что “во всяком органическом соединении атом водорода может быть скачкообразно заменен группой CH3” (Кольцов, 1915). Позже, идея о влиянии негенетических факторов на реализацию генотипа, о множественности “эпигенетических траекторий”, возможных для одного генотипа, была развита Конрадом Х. Уодингтоном (Waddington, 1968), а открытие роли метилирования ДНК и гистоновых белков в эпигенетической регуляции действия генов полностью подтвердили предсказание Н.К. Кольцова. Сегодня, благодаря значимым успехам в изучении молекулярно-генетических механизмов эпигенетических изменений, эпигенетика стала одним из важнейших направлений генетики, биологии развития и молекулярной биологии. Хотя само понятие эпигенетики трактуется в разных источниках по-разному (см. обзор Тиходеев, 2015), большинство исследователей согласны с тем, что эпигенетические изменения – это модификационные изменения не связанные с изменениями последовательности ДНК, но способные к сохранению в ряду клеточных поколений даже в отсутствие факторов, вызвавших эти изменения (Jablonka, Raz, 2009; Ptashne, 2013; Noble, 2015). Наследуемые изменения экспрессии аллелей генов, вызванные эпигенетическими модификациями (ЭМ), называют эпиаллелями.

Эпигенетические механизмы регуляции генной экспрессии лежат в основе целого ряда биологических процессов, обеспечивающих существование и развитие растений и животных (Эллис и др.,

Список сокращений: ЭМ – эпигенетические модификации, ЭР – эпигенетические регуляторы, 5mC – 5-метилцитозин, ТФ – транскрипционный фактор, ДМУ – дифференциально метилированные участки генома.

2010). Без поддержания гетерохроматинового состояния центромерных и теломерных районов, невозможно функционирование хромосомного аппарата в ходе митоза и мейоза. Состояние хроматина, которое определяется наличием “эпигенетических меток” (модифицированных вариантов гистоновых белков и метилцитозина в ДНК), влияет на процессы репарации и транскрипции (Разин, Быстрицкий, 2009). ЭМ защищают целостность генома, подавляя транскрипцию генов мобильных элементов, а значит и возможность их перемещения и размножения (Fultz et al., 2015). Эпигенетическая инактивация (замолкание) дуплицированных генов после алло- и автоплоидии, геномных дупликаций позволяет обеспечить геномный гомеостаз и открывает возможности для эволюции функции генов (Song, Chen, 2015). Компенсация дозы генов половых хромосом, хорошо исследованная у животных, имеет место и у двудомных растений с половыми хромосомами и также основана на ЭМ (Muyle et al., 2017, 2018).

Ключевую роль ЭМ играют в процессах развития. Переход на новый этап онтогенеза и развитие каждой новой структуры связаны с локальным эпигенетическим перепрограммированием, т.е. подавлением экспрессии генов, активных на предшествующей стадией, и, одновременно – активацией новой группы генов, определяющих специфику нового органа/стадии (Xiao, Wagner, 2015; Xu et al., 2018; Yan et al., 2020). Установленный профиль генной экспрессии сохраняется клеточными потомками. Именно клеточная память, основанная на эпигенетических механизмах, лежит в основе поддержания на протяжении всего онтогенеза структурно-функциональных особенностей всех тканей и органов многоклеточных организмов (Nashun et al., 2015; Birnbaum, Roudier, 2016).

Эпигенетические процессы, которые являются неотъемлемой частью генетической программы развития и инициируются внутренними сигналами, называют **конститутивным эпигенетическим контролем развития** (Bräutigam, Cronk, 2018). При нарушении функции ключевых эпигенетических регуляторов клетки растений утрачивают способность поддерживать клеточную идентичность (дифференцированное состояние), приобретают каллусные характеристики и способность к соматическому эмбриогенезу (Aichinger et al., 2009; Chen et al., 2010; Bratzel et al., 2010).

Все перечисленные функции ЭМ являются общими для животных и растений. Вместе с тем, ЭМ у растений выполняют дополнительную функцию адаптации к локальным условиям среды, к воздействиям неблагоприятных факторов за счет изменения программ развития. Взаимодействие между программами развития и программами адаптивного (стрессового) ответа позволяет быстро находить оптимальную жизненную стратегию в условиях ограниченного пула ресурсов (Herms, Mattson, 1992; Huot et al., 2014). Это возможно благодаря тому, что разнообразные неблагоприятные условия (дефицит света, воды, питания, гипо- или гипертермия, воздействие патогенов и пр.) могут инициировать частичное эпигенетическое перепрограммирование генома, которое открывает возможность для изменения программы развития. Эпигенетическую корректировку генетически обусловленной программы развития в ответ на действие внешних сигналов, называют **факультативным эпигенетическим контролем развития** (Bräutigam, Cronk, 2018).

Возможность изменения программы развития принципиально важна в условиях прикрепленного или пассивного (у водных растений) образа жизни и обусловливает удивительную пластичность онтогенеза, характерную именно для растений (Серебряков, Серебрякова, 1972; Жукова, Глотов, 2001; Калинкина, 2017; Sultan, 2017; Нотов, Жукова, 2019). Более того, у растений фенотипические изменения, вызванные внешними воздействиями, могут поддерживаться вегетативными и половыми потомками (Hauser et al., 2011; Heard, Martienssen, 2014; Lämke, Bäurle, 2017; He, Li, 2018). В этом обзоре основное внимание будет уделено рассмотрению роли ЭМ в проявлении этой удивительной способности к перепрограммированию онтогенеза и анализу механизмов, которые могут инициировать эпигенетическое перепрограммирование онтогенеза и появление морфотипов под действием синганалов окружающей среды.

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ПЛАСТИЧНОСТИ РАЗВИТИЯ

Пластичность развития – важнейшее условие выживания в условиях прикрепленного образа или пассивного (у водных растений) образа жизни. Она обусловлена ***способностью растительных клеток изменять свою идентичность*** в ответ на сигналы от окружающих клеток, физиологические сигналы и сигналы из окружающей среды. Эта способность, установленная с использованием химерных растений (Poethig,1989; Irish, 1991; Szymkowiak, Sussex, 1996) и в экспериментах по регенерации *de novo* корней (обзоры Xu, 2018; Li, 2021) и побегов (Shin et al., 2020; Lardon, Geelen, 2020) из различных органов, свидетельствует о том, что растительные клетки с легкостью меняют генетическую программу развития.

У растения ***образование новых органов происходит на всем протяжении онтогенеза***, поэтому изменения программы онтогенеза могут происходить на любой стадии жизненного цикла, в том числе и у взрослого растения. Эти изменения облегчаются тем, что они могут затрагивать не весь организм, а отдельные его части, поскольку ***растения имеют модульное строение*** (Hallé, 1986; Oborny, 2019). Модули образуются последовательно как результат функционирования апикальных меристем побега и корня. Модуль побега – это междоузлие с листом и пазушной меристемой. Корневой модуль – фрагмент с корнем и отходящим от него боковым корешком. При изменении условий (внешних или внутренних) может меняться судьба отдельных, наиболее молодых модулей. Такая локальная перестройка морфогенеза может обеспечить адаптацию образующихся частей растения к новым условиям, не изменяя всей структуры растения.

Благодаря эпигенетическим механизмам новая программа может сохраняться не только клеточным клоном, но и вегетативными поколениями, поскольку многие ***растения способны к вегетативному размножению***. Получено много экспериментальных данных о наследовании вегетативным потомством профиля метилирования ДНК, вызванного стрессовыми воздействиями на материнские растения. У клевера ползучего *Trifolium repens* (Leguminósae) изменения метилирования ДНК, вызванные воздействием засухи на материнское растение, сохранялись у 5 исследованных вегетативных поколений (Rendina González et al., 2018). Специфичный профиль метилирования у клонов инвазивного растения очереднопы́льника, прозванного сорняком аллигатора, *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae) из разных эколого-географических мест Китая сохранялся при перенесении в общие условия в течении 2–3 поколений, хотя часть ЭМ (38%) сохранялись на протяжении 10 вегетативных поколений (Shi et al., 2019).

Стабильная передача отдельных эпиаллелей потомству показана и на многих видах с облигатным генеративным размножением – у льнянки *Linaria vulgaris*, арабидопсис *Arabidopsis thaliana*, кукурузы *Zea mays*, риса *Oryza sativa*, томатов *Solanum lycopersicum* и др. (Cubas et al., 1999; Kakutani, 2002; Manning et al., 2006; Miura et al., 2009; O'Malley, Ecker, 2012; Zhang et al., 2012; Weigel, Colot, 2012; Johannes, Schmitz, 2019). Некоторые эпиаллели растений настолько стабильны, что демонстрируют моногенные расщепления и их сложно отличить от моногенных мутаций (Bondada et al., 2020).

Передаче половому потомству ЭМ способствует ***отсутствие характерного для животных глобального деметилирования генома*** в процессе гаметогенеза и раннего эмбриогенеза (Pikaard, Scheid, 2014). Эта особенность и действующие в клетках растений молекулярные механизмы поддержания ЭМ (см. далее) объясняют удивительно высокую долю стабильно поддерживающихся сайтов метилцитозина (91%) и районов метилирования (99.998%) в генетически однородных имбредных линиях арабидопсис (МА-линиях), которые получены от единственного растения – основателя путем самоопыления в течение 30 поколений (Schmitz et al., 2011; Hofmeister et al., 2017).

Важной особенностью растений является ***отсутствие рано обособляющихся клеток зародышевого пути***. У растений генеративные клетки образуются из инициальных клеток зародышевого пути, которые отличаются от окружающих соматических клеток меристем только положением в апексе побега, но не характером детерминации, и в случае гибели могут быть заменены соматическими (Whipple, 2012; Pikaard, Scheid, 2014). Следовательно, генетическая и эпигенетическая информация соматических клеток потенциально может быть передана потомству.

Таким образом, особенности растений обусловливают возможность их выживания при прикрепленном/пассивным образе жизни. Изменяя генетическую программу развития, растения могут адаптировать онтогенез к условиям среды, проявляя пластичность развития. Новый вариант онтогенеза может сохраняться за счет эпигенетических механизмов и даже передаваться вегетативному и половому потомству. Благодаря этим особенностям вариабельность фенотипа растений может принимать форму поливариантности, т.е. существования определенных морфотипов на основе одного генотипа.

КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ МОГУТ ВЛИЯТЬ НА ФЕНОТИП

Основным механизмом эпигенетических модификаций у растений является метилирование ДНК и модификация гистоновых белков. К эпигенетическим явлениям относят и так называемое белковое наследование, т.е. наследование клеточным клоном измененной конформации белковых молекул, описанное у дрожжей, животных и человека (Harvey et al., 2018). Прионо-подобные белки обнаружены и у растений. Однако в норме они не образуют агрегаты в клетках, поскольку этому препятствуют метаболиты растений (Surguchov et al., 2019).

ЭМ ДНК и гистонов осуществляют 3 группы генов (Pikaard, Scheid, 2014; Allis, Jenuwein, 2016). Гены 1-ой группы (writers) кодируют ферменты, осуществляющие модификации ДНК (метилирование цитозина) и гистонов (метилирование, ацетилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, сумоилирование гистонов и пр.). Гены 2-ой группы (erasers) осуществляют противоположную функцию, убирая эти метки. Гены 3-ей группы (адапторные белки или readers) распознают эпи-

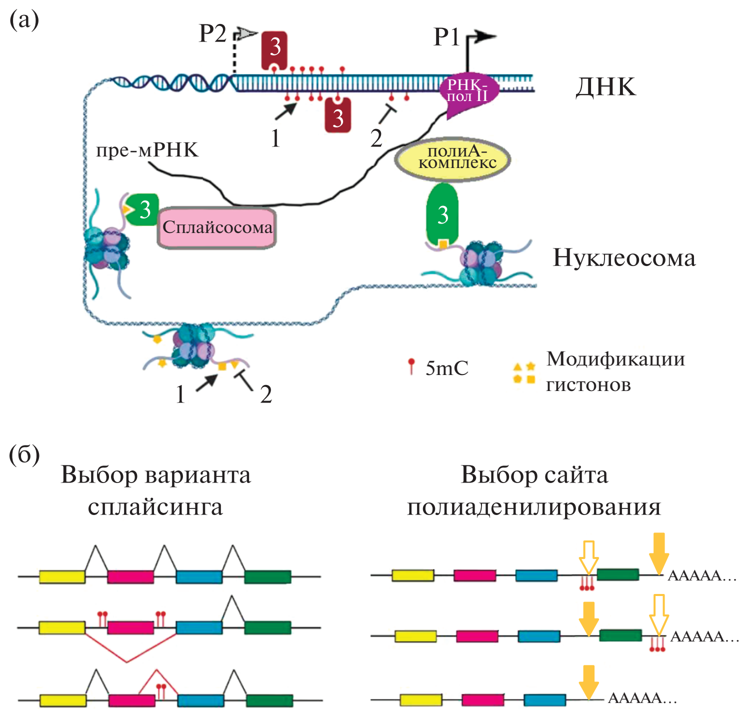


Рис. 1. Основные группы эпигенетических регуляторов и их влияние на экспрессию генов. (а) – эпигенетические регуляторы 1-ой группы (1 – writers, стрелки) осуществляют метилирование ДНК (вверху) и модификацию гистонов (внизу); регуляторы 2-ой группы (2 – erasers, тупые стрелки) удаляют эпигенетические метки с ДНК и гистоновых белков; регуляторы 3-ей группы (3 – readers) распознают метки; взаимодействуя с белками РНК-полимеразного комплекса (РНК-пол II), они могут влиять на выбор промотора (показаны альтернативные промоторы P1, P2) и скорость транскрипции. Взаимодействуя с белками сплайсеосомы и комплекса полиаденилирования (полиА), белки 3-ей группы могут вмешиваться в процессы сплайсинга и полиаденилирования пре-мРНК; (б) – за счет таких взаимодействий может наблюдаться исключение экзонов и использование альтернативных сайтов сплайсинга (справа), а также образование укороченных мРНК из-за использования альтернативных сайтов полиаденилирования (справа). Это приводит к формированию разных изоформ зрелой мРНК и белка. Широкие стрелки указывают на альтернативные сайты сплайсинга или полиаденилирования.

генетические метки и через взаимодействие с другими белками влияют на разнообразные клеточные процессы (рис. 1). Некоторые белки могут совмещать в себе разные функции. Например, хромометилазы CMT являются одновременно белками 1-ой и 3-ей групп, поскольку распознают гистоновые репрессивные метки и метилируют ДНК в непосредственной близости от этих меток (Zhang et al., 2018). Точно также, гистоновые H3K9-метилтрансферазы осуществляют свою главную функцию после распознавания метилцитозина 5mC (Li et al., 2018). Однако приведенная выше классификация помогает систематизировать обширную информацию по эпигенетической регуляции.

1 группа – writers. К этой группе относятся гены, кодирующие ДНК-метилтрансферазы и гистоновые метилтрансферазы. В отличие от животных, у которых метилируется главным образом цитозин, соседствующий с гуанином (CG-сайты), у растений может метилироваться цитозин в любом окружении (CG, CHG и CHH, где H это A, C или T). Это связано с существованием уникального семейства генов хромометилаз CHROMOMETHYLASE (CMT), а также генов, контролирующих путь РНК-зависимого метилирования ДНК, или RdDM (RNA-directed DNA Methylation pathway). RdDM-путь основан на механизме РНК-интерференции, в котором участвуют варианты консервативных комплексов Dicer и Rinc (включающие белки DLC и AGO, соответственно), а также специфические для растений РНК-полимеразные комплексы IV и V (Zhang et al., 2018; Raju et al., 2019; Gallego-Bartolomé, 2020).

Влияние метилирования ДНК на экспрессию генов зависит от того, в каком контексте метилируется цитозин, от места расположения сайтов метилирования. Метилирование цитозина в регуляторных частях гена чаще всего ассоциировано со снижением уровня транскрипции (Ванюшин, 2006; Law, Jacobsen, 2010). Однако в отдельных случаях, за счет взаимодействия с белками из 3-ей группы, эффект может быть и противоположным (Harris et al., 2018). Метилирование гистонов ассоциировано либо с активацией, либо с репрессией генов в зависимости от позиции и числа метильных групп. H3K4me3, H3K9me3 и H3K36me3 корредлирует с активацией транскрипции, в то время как присутствие метки H3K27me3 маркирует гены со сниженным уровнем транскрипции (Zhang et al., 2007, 2009; Roudier et al., 2011). Метки H3K9me2 и H3K27me1 обычно локализованы в центромерных районах хромосом и типичны для повторов и мобильных элементов, которые содержат и высоко метилированную ДНК (Bernatavichute et al., 2008; Zhang et al., 2009; Roudier et al., 2011).

Метилирование гистонов осуществляют несколько семейств гистоновых метилтрансфераз, которые метилируют разные лизиновые остатки и работают в составе разных белковых комплексов, среди которых наиболее изучены PRC1-, PRC2-комплексы (Liu et al., 2010). В состав этих комплексов входят и гистоновые деацетилазы (присутствуют в PRC1, PRC2), и гистоновые убиквитиназы (PRC1), которые также вызывают компактизацию хроматина и репрессию генов (Derkacheva, Hennig, 2014; Mozgova, Hennig, 2015; Xiao, Wagner, 2015; Förderer et al., 2016).

Гистоновые ацетилазы разрыхляют хроматин и активируют генную экспрессию, а убиквитинирование оказывает либо активирующее, либо репрессирующее влияние на состояние хроматина. На состояние хроматина могут влиять и другие модификации гистоновых белков (Berger, 2007; Fenley et al., 2018), хотя их участие в эпигенетических процессах менее изучено. Гистоновые ацетилазы и убиквитиназы также могут работать в составе различных белковых комплексов, включая комплексы, поддерживающие активное состояние хроматина (Fletcher, 2017; Ornelas-Ayala et al., 2021).

2 группа – erasers. Активное удаление метильных групп с цитозина у растений осуществляется специфическими для растений ферментами с гликозилазной активностью, которые вырезают метилированный цитозин и инициируют его замену на неметилированный цитозин (Li et al., 2018; Parrilla-Doblas et al., 2019; Liu, Lang, 2019). Удаление ацетильных и метильных групп с гистоновых белков осуществляют несколько семейств гистоновых деацетилаз (Ma et al., 2013; Chen et al., 2020) и деметилаз (Prakash et al., 2014), среди которых есть специфические для растений.

3 группа – readers распознают (“прочитывают”) установленные метки или их отсутствие. Это самая разнообразная группа эпигенетических регуляторов (ЭР), которые также чаще всего действуют в составе белковых комплексов (Torres, Fujimori, 2015; Grimanelli, Ingouff, 2020). Нередко readers считывают одновременно разные гистоновые метки, включая фосфорные и убиквитиновые. К эпигенетическим регуляторам этой группы часто относят и хроматиновые белки, которые могут распознавать ЭМ и влияют на нековалентиное взаимодействие ДНК с гистоновыми белками, изменяют плотность упаковки и локализацию нуклеосом, а также катализируют включение гистоновых вариантов (Li et al., 2007; Narlikar et al., 2013).

В составе белков 3-ей группы имеются не только сайты связывания с метилцитозином ДНК или гистоновыми метками, но и сайты связывания с негистоновыми белками. За счет этого readers обеспечивают взаимодействие между эпигенетическими метками (модификациями гистонов и ДНК) и другими клеточными процессами, в которых участвует негистоновый белок (Li, Li, 2012; Patel, 2016; Grimanell, Ingouff, 2020). Например, белки readers могут взаимодействовать с белками, устанавливающими или убирающими метки с ДНК и гистонов, способствуя распространению меток или их снятию (Grimanell, Ingouff, 2020; Scheid et al., 2021). Могут способствовать открытию хроматина, за счет включения гистоновых вариантов, изменяющих состояние хроматина (Kouzarides, 2007; Sijacic et al., 2019). Они могут прямо влиять на транскрипцию, взаимодействуя с транскрипционными факторами (ТФ) или их кофакторами или сами иметь ДНК-связывающий домены, выступая в качестве ТФ-пионеров, аффинность и специфичность действия которых зависят от присутствия в ДНК метилцитозина (Kribelbauer et al., 2019; Grimanell, Ingouff, 2020; Zhu et al., 2016).

Белки 3-ей группы способны влиять на выбор промоторов (Le et al., 2020), а также на пост-транскрипционные события (рис. 1). Взаимодействуя с белками РНК-полимеразного комплекса, белками, контролирующими созревание пре-мРНК (белками, вовлеченными в полиаденилирование, сплайсинг), ридеры определяют выбор сайтов сплайсинга (Ullah et al., 2018; Wei et al., 2018; Wu et al., 2020) и сайтов полиаденилирования (Duan et al., 2017; Zhang et al., 2021). Из этого следует, что readers являются участниками регуляции экспрессии генов на разных этапах реализации генетической информации, сопрягая эпигенетические метки ДНК и гистонов с базовыми механизмами регуляции генной экспрессии. По сути, эпигеном определяет, какие гены транскрибируются в данной ткани, какой из альтернативных промоторов, сайтов сплайсинга, полиаденилирования будет выбираться в данном клеточном клоне, а значит – и какие из изоформ белка будут функционировать в данной ткани, на данной стадии онтогенеза и при данных условиях окружающей среды. Таким образом, ЭМ не только сохраняют профиль экспрессии, который установлен в результате действия ТФ, но и участвуют в его установленовлении на всех этапах образования и созревания мРНК.

Рассмотренные 3 группы генов контролируют ЭМ не только у растений, но и у животных. Однако регуляция экспрессии этих групп генов у растений должна иметь свои особенности. С одной стороны, работа этих генов должна зависеть от условий среды. Т.е. у растений должны существовать механизмы, которые могут инициировать частичное эпигенетическое репрограммирование генома и установление новой программы развития в изменившихся условиях среды. Но с другой стороны – растения должны иметь способность сохранять новую адаптивную программу развития и передавать ее потомкам. Это парадоксальное сочетание стабильности и лабильности ЭМ указывает на существование у растений особых механизмов, контролирующих динамику ЭМ. Рассмотрим имеющиеся данные, которые хотя бы частично могут объяснить уникальные особенности эпигенетической регуляции у растений.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ НАСЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЯМИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ

ЭМ различаются по стабильности наследования половыми поколениями и, как правило, не подчиняются Менделевским закономерностям. Тем не менее, наследуемость, хотя бы в форме “наследуемой нестабильности” (“heritable changeability” Le Goff et al., 2021) – это характерная особенность ЭМ, присущая именно растениям.

Способность ЭМ сохраняться в мейозе отчасти объясняется особенностями биологии растений (см. выше). Тем не менее, есть и молекулярные механизмы, которые поддерживают эту способность. Их действие зависит от типа эпиаллели (“молчащая” гиперметилированная аллель или активно работающая гипометилированная эпиаллель), от копийности генов, от наличия в локусах специальных мотивов, которые привлекают ДНК-метилтрансферазы или другие ЭР, от числа сайтов метилирования ДНК, их типа (CG, CHG, CHH) и локализации в гене, от присутствия модификаций гистонов и их типа (Catoni et al., 2017; Li et al., 2020; Williams, Gehring, 2020).

Эти зависимости сложны и до конца не исследованы. Тем не менее, главными инструментами сохранения ЭМ являются поддерживающие ДНК-метилтрансферазы, которые есть и у животных, а также специфические для растений механизмы положительной обратной связи между хроматиновыми метками и метками метилцитозина (5mC). При поддержании установленного эпигенетического профиля хромометилазы CMT метилируют ДНК, ориентируясь на присутствие хроматиновых меток H3K9me2, а гистоновые метилтрансферазы KYP/SUVH4 и др. – на присутствие 5mC (Baubec et al., 2010; Du et al., 2015; Stoddard et al., 2019). Этот механизм объясняет стабильное “молчание” гиперметилированных аллелей (например, в гене арабидопсис *SUP*).

Положительная обратная связь имеется при установлении метилирования *de novo* с участием малых РНК (RdDM путь). В этом многокомпонентном процессе важную роль играют белки 3-ей группы (readers). Одни readers распознают хроматиновые метки метилированного H3K9me2 и ориентируют работу РНК-полимеразы IV, участвующей в образовании малых РНК. Другие – распознают 5mC и привлекают РНК-полимеразу V, которая через посредников (прежде всего – белка AGO с загруженной в него малой РНК) может привлекать к участкам ДНК, с которых считывается пре-мРНК, специфическую ДНК-метилтрансферазу *de novo* DRM2 (Matzke, Mosher, 2014; Erdmann, Picard, 2020). Благодаря этим механизмам, появившиеся при репрограммировании генома ЭМ, будут поддерживаться до тех пор, пока в процесс не вмешаются другие регуляторы, которые могут активироваться изменением окружающих условий (см. далее). Активирующие гистоновые метки H3K4me3 и H3K18ac препятствуют работе RdDM пути и привлекают ДНК-деметилазу/гликозилазу ROS1, которая снимает метки 5mC и создают условия для стабильного поддержания гипометилированных эпиаллелей (Li et al., 2020).

Образовавшиеся малые РНК, постоянно генерирующиеся в ходе позитивной обратной петли, могут передвигаться по растению по плазмодесмам и по флоэме (Tamiru et al., 2018; Pagliarani, Gambino, 2019), а возможно и передаваться потомкам, как это показано для нематоды *C. elegans* (Xu et al., 2018). У растений пока не получено четких доказательств участия малых РНК, вызванных стрессовым воздействием на родителей, в передаче эпигенетической информации потомкам (Morgado et al., 2017; Colicchio et al., 2020). Тем не менее, возникшие мобильные малые РНК могут проникать в герминальные клетки (Duempelmann et al., 2020) и инициировать в них метилирование ДНК и последующие модификации гистонов, которые могут передаваться потомкам и приводить к наследованию фенотипических изменений – онтогенетических или физиолого-биохимических изменений, связанных с устойчивостью к стрессу, испытанному родительскими растениями (Tamiru et al., 2018; Liegard et al., 2019).

Поддержанию в череде поколений эпигенетических меток в определенных генных локусах могут способствовать повторы, которые часто представляют собой в той или иной степени деградировавшие мобильные элементы, встроившиеся в регуляторную область генов. Так, наличие повторов в регуляторной области гена арабидопсис *FWA* и кукурузы *B1* объясняет частое возникновения эпиаллелей этих генов (Henderson, Jacobsen, 2007). О стабильности ЭМ таких генов говорит тот факт, что на основе аналогичных ЭМ создан ряд сортов хозяйственно ценных культур (обзор Lisch, 2013).

В геномах млекопитающих найдены нуклеотидные мотивы, которые способствуют привлечению ДНК-метилтрансфераз к регуляторным участкам определенных локусов (Handa et al., 2005; Wienholz et al., 2010; Wang et al., 2019). Они есть и у растений, хотя менее изучены (Gouil, Baulcombe, 2016). Особенности структуры локусов, делающие их излюбленными мишенями ЭРегуляторов, могут объяснить неоднократно наблюдающиеся случаи возникновения стабильных эпиаллелей некоторых генов. Однако знания об особенностях ДНК или хроматина, которые могут превращать локусы в "горячие" и "холодные" точки ЭМ не достаточны. Например, до сих пор не ясно, почему такой "горячей" точкой ЭМ является ген *SUP* арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*), который участвует в разграничении в цветке участков с мужскими и женскими репродуктивными органами (Bowman et al., 1992). Гиперметилированные "молчащие" эпиаллели в этом гене возникали при использовании индуцированного мутагенеза (нейтроны, Х-лучи, этилметансульфонат и др. химические мутагены), инсерционного Т-ДНК-мутагенеза (Jacobsen, Meyerowitz, 1997; Rohde et al., 2002), на фоне деметилирования генома у трансгенных линий с подавленной активностью гена ДНК-метилтрансферазы *MET1* (Kishimoto et al., 2001), а также спонтанно (Bondada et al., 2020). Причем эпиаллели гена *SUP* с разной степенью экспрессивности и пенетрантности были обнаружены в 11 (из 1028) экотипах арабидопсис из самых разных мест обитания (Bondada et al., 2020).

Поддержание ЭМ в определенных локусах может обусловливаться наличием в их регуляторных участках цис-элементов для связывания ТФ, которые привлекают с собой ЭР (например, ДНК-метилтрансферазы или деметилазы), поддерживая гиперметилированное или наоборот – гипометилированное состояние локусов. Длинные некодирующие РНК (lncРНК) также могут привлекать ЭР к определенным локусам. Это показано для lncРНК *COLDAIR*, которая эпигенетически подавляет ген арабидопсис *FLC*, контролирующий потребность в яровизации (Kim et al., 2017; Wu et al., 2020), а также для lncRNA *AG-incRNA4*, которая вызывает замолкание в вегетативной части побега гена *AG*, контролирующего развитие репродуктивных органов в цветке (Wu et al., 2018). Благодаря взаимодействию с ЭР, ТФ и lncРНК могут вызывать ЭМ в генах-мишенях, у которых есть либо цис-элементы для привлечения ТФ, либо участки гомологии с lncРНК. Такие эффекторы ЭМ, экспрессия которых активируется в определенных условиях (или при стрессовых воздействиях), по-видимому, могут играть важную роль как в инициации ЭМ под действием новых условий/стрессов, так и в поддержании возникших эпиаллелей в ряду поколений при сохранении изменившихся условий (например, в 11 поколениях имбредных линий риса выращиваемых в условиях засухи (Zheng et al., 2017).

Ярким свидетельством наследования ЭМ у растений является установленное при изучении имбредных линий арабидопсис (МА-линии, полученных от самоопыления одного растения экотипа Col) стабильное наследование 99.998% районов метилирования на протяжении 30 генеративных поколений в неизменных условиях среды (Hofmeister et al., 2017). Такая стабильность позволила осуществить создание эпигенетической карты на основе анализа F2 поколения от скрещивания двух МА-линий и показать, что примерно половина дифференциально метилированных районов наследуется в соответствии с Менделевскими закономерностями (Hofmeister et al., 2017).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ИНИЦИИРУЮЩИЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ

Среди факторов, которые влияют на работу ЭР и инициируют частичное репрограммирование генома – многие стрессовые факторы (как абиотические, так и биотические). Они вызывают изменения метаболических процессов и появление в клетках активных форм кислорода (АФК) и азота, которые измененяют окислительно-восстановительный баланс клетки и активируют редокс-зависимые сигнальные системы (Foyer, Noctor, 2013; Locato et al., 2018). Следствием этих процессов являются изменение содержания молекул – доноров метильных групп, необходимых для модификации ДНК и гистонов (прежде всего – S-аденозилметионина), а также воздействие АФК и метаболитов на белки – регуляторы эпигенетических модификаций (Locato et al., 2018; Saravana Kumar et al., 2020; Lindermayr et al., 2020). Среди последних – ДНК-деметилирующие ферменты (Couturier et al., 2013; Duan et al., 2015), белки, участвующие в РНК-зависимом метилировании ДНК (Charbonnel et al., 2017; Seta et al., 2017). Описано влияние редокс-потенциала и оксида азота, который также является мощным оксидантом, на белки, вовлеченные в метилирование ДНК и модификацию гистоновых белков (обзоры Locato et al., 2018; Saravana Kumar et al., 2020; Lindermayr et al., 2020). Поскольку у растений метилируется цитозин в любом окружении, растения особенно чувствительны к метаболическим изменениям, вызывющим снижение уровня доноров метильных групп в клетках (Lindermayr et al., 2020).

Недавно выявлен дополнительный механизм связи между стрессовыми воздействиями и репрограммированием генома. Показано, что в активации стрессового ответа (тепловой шок, гипотермия, засуха, дифицит фосфатов, атака патогенов), важную роль играет сумоилирование – обратимая посттрансляционная модификация различных белков (Jmii, Cappadocia, 2021). Важнейшей мишенью Сумо-Е3 лигазы SIZ1 является ДНК-гликозилаза ROS1, которая стабилизируется в результате этой модификации и осуществляет деметилирование ДНК. Мутации в гене *SIZ1* у арабидопсис приводят к повышению уровня метилирования ДНК за счет уменьшения содержания белка ROS1 (Kong et al., 2020). Сумоилирование белков – динамичный и обратимый процесс, который активируется стрессовыми воздействиями. Поэтому в условиях стрессовых воздействий сумоилирование белков через влияние на деметилирование ДНК может играть важную роль в репрограммировании генома растений.

Условия среды/стрессы могут изменять активность ЭР как на посттрансляционном уровне, так и на транскрипционном. Многие ЭР транскрибируются специфически, только при определенных условиях/стрессовых воздействиях или в определенных тканях и органах на определенных стадиях онтогенеза. Специфичность транскрипции показана у разных видов растений для ДНК-метилтрансфераз (Rohini et al., 2014; Guo et al., 2020; Yu et al., 2021) и других ЭР. Более того, среди ЭР, которые относятся к одному классу (например, ДНК-деметилаз/гликозилаз) наблюдаются и некоторые различия между генами-мишенями, что может объясняться наличием в мишенях специфических мотивов, привлекающих к себе ЭР, или тем, что в привлечении к генам-мишеням участвуют ТФ или lncРНК, которые взаимодействуют с определенным набором генов-мишеней (см. выше). Заметим лишь, что среди ТФ, которые взаимодействуют с ЭР, есть и компоненты гормональных сигнальных путей. Привлекая ЭР, изменяющие состояние хроматина к своим генам-мишеням, ТФ способны либо активировать (Wu et al., 2015), либо подавлять экспрессию генов (Hasegawa et al., 2018) в ответ на действие гормонов.

Большинство упомянутых факторов, которые способствуют изменению программы развития при изменении условий среды, действуют в той или иной мере на эпигенетические процессы и в клетках животных. Вместе с тем, у растений появляется информация об особенностях работы некоторых ЭР, а также об обнаружении новых специфических для растений ЭР. Среди последних – 4 гена арабидопсис, возникших в результате доместикации транспозонов семейства Harbinger. Продукты двух таких генов *HDP1* и *HDP2* работают в составе белкового комплекса IDM1, который обладает активирующей гистон-ацетилтрансферазной активностью и, одновременно, участвует в привлечении ДНК-деметилазы/гликозилазы ROS1 (Duan et al., 2016). Продукты двух других генов – *ALP1* и *ALP2* – также работают вместе и мешают компллексу PRC2 осуществлять репрессивное метилирование гистонов H3K27me3 (Liang et al., 2015; Velanis et al., 2020).

Гены *ICU11* и *CP2*, найденные у арабидопсис, также взаимодействуют с белками PRC2-комплекса (Mateo-Bonmatí et al., 2018; Bloomer et al., 2020). Однако это взаимодействие приводит к усилению эффективности эпигенетического подавления генов-мишеней. Предполагается, что эти гены, кодирующие 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимые диоксигеназы, каким-то образом помогают удалять с гистонов активирующие метки H3K4me2/3 и H3K36me3, что облегчает дальнейшее установление репрессивных меток (Bloomer et al., 2020). Недавно у арабидопсис найден ген *CFK1*, кодирующий белок с F-боксом, который взаимодействует с *de novo* ДНК-метилтрансферазой и запускает процесс ее деградации (Chen et al., 2021).

Кроме этих новых генов, которые вмешиваются в работу уже описанных ЭР, у растений выявлены гены, которые являются представителями известных семейств эпигенетических регуляторов, но осуществляют функцию противоположную той, что выполняют их паралоги. Многие ЭР у растений представлены несколькими генами, что связано с характерной для растений задуплицированностью генома. Функция далеко не всех представителей исследована, и их изучение приносит сюрпризы. Так, например, семейство SUVH гистоновых H3K9-метилтрансфераз (SU(VAR)3-9 HOMOLOG) у арабидопсис представлено 9 паралогами, среди которых SUVH4/KYP, SUVH5 и SUVH6 действительно осуществляют репрессивное метилирование H3K9. Благодаря присутствию SRA-домена они распознают метилированную ДНК и метилируют гистоны в непосредственной близости от этих участков (Li et al., 2018). В то же время, SUVH1, SUVH3, SUVH7 и SUVH8 выполняют противоположную функцию. Они утратили метил-трансферазные домены, но за счет SRA-домена распознают метилированную ДНК в промоторной области ДНК-деметилазы/гликозилазы ROS1. Взаимодействуя с белками – активаторами транскрипции с DnaJ-доменом, белки SUVH1, SUVH3, SUVH7, SUVH8 активируют транскрипцию ROS1, а значит – и последующее деметилирование ДНК (Xiao et al., 2019). Примеров такой субнеофункциолизации генов, по-видимому, будет больше по мере углубления знаний о функции паралогов ЭР у растений.

В заключение раздела отметим, что результатом частичного репрограммирования генома под действиями окружающей среды может быть активация генов защитного ответа или/и изменение программы онтогенеза растения (его растущих модулей). Изменение программы развития того или иного модуля/органа реализуется на ранних

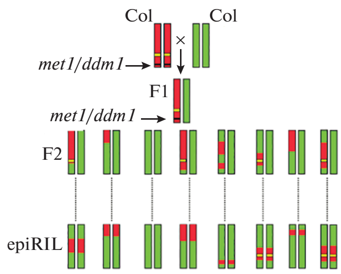
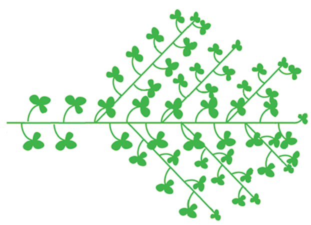
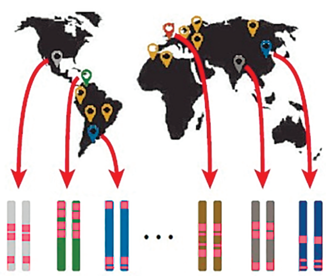
Рис. 2. Онтогенетические реверсии у календулы лекарственной *Calendula officinalis* (сорт, созданный В.В. Сахаровым в Институте биологии развития РАН имени Н.К. Кольцова) и гравилата речного *Geum rivale* в условиях влажного холодного лета 2019 г. На одном растении календулы наряду с соцветиями с нормальным онтогенезом (а) можно наблюдать соцветия, формирующие новые апикальные меристемы (б, в), которые также образуют соцветия и семена ((в) – внизу – корзинка 1-ого порядка с созревшими семенами, а вверху – образованные ею 15 дополнительных соцветий 2-ого порядка, которые находятся на разных этапах онтогенеза). На одном растении гравилата с нормальным онтогенезом цветка (г) встречаются цветки, в центре которых формируются новые побеги с соцветиями (д, е). Фото автора.

этапах его онтогенеза, чаще всего – в клетках апикальных меристем побега и корня, которые содержат стволовые (плюрипотентные) клетки и дают начало всем примордиям органов. Однако, запуск (или перезапуск) программы развития у растений может наблюдаться даже в зрелых органах (Ежова, Куприянова, 2019). Это объясняется тем, что плюрипотентные клетки у растений могут появляться *de novo* за счет снятия эпигенетической репрессии с генов стволовости, которая в дифференцированных тканях поддерживается многочисленными ЭР (Альберт, Ежова, 2013; Gaillochet, Lohmann, 2015). Снятие эпигенетической репрессии с генов стволовости может обусловить развитие дополнительных лопастей и гребневидных выростов даже на зрелых листьях растений (Fedotov et al., 2017; Куприянова и др., 2021). Онтогенетические реверсии, которые вызываются погодными условиями, также отражают возможность перезапуска генетических прогамм развития за счет возабновления пула стволовых клеток (рис. 2).

ОСНОВНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ В ПОЛИВАРИАНТНОСТИ РАЗВИТИЯ

Пластичность развития растений проявляется в ярко выраженной вариабельности признаков у растений одного вида. Стохастические колебания уровня экспрессии, а также изменения экспрессии генов, вызванные внешними и внутренними факторами, изменяющие развитие, далеко не всегда связаны с ЭМ. Для доказательства причинно-следственной связи между ЭМ и фенотипом

Таблица 1. Экспериментальные подходы, которые используются для изучения роли эпигенетических модификаций в проявлении поливариантности развития растений

Объекты		Методы	Возможности
1. Рекомбинантные имбредные линии epiRIL, полученные на едином генетическом фоне, среди которых есть фенотипические различия		Анализ генома, метилома, транскриптома, генетическое картирование (epiQTL)	Выявление ДМУ/генов (эпиаллелей), обусловливающих фенотипические различия
2. Клоны природных и культурных видов из разных эколого-географических зон; клоны, отличающиеся по фенотипу		Анализ уровня и особенностей метилирования генома (MSAP и др. методы) Анализ уровня генетической изменчивости (AFLP)	Демонстрация связи фенотипа с эпигенотипом
3. Единичные растения, у которых разные модули или органы имеют фенотипические различия		Те же, что и во 2-ом подходе	Выявление эпигенетического мозаицизма и его связи с фенотипическими различиями
4. Популяции одного вида из разных эколого-географических зон, отличающиеся по фенотипу		Те же, что и во 2-ом подходе (немодельные виды)	Демонстрация внутривидовых генетических и эпигенетических различий
		Анализ генома, метилома, транскриптома, EWAS (Epigenome-Wide Association Studies, модельные виды)	Выявление ассоциаций фенотипа с ДМУ/генами

необходимо убедиться в отсутствии связи фенотипа с генетическим полиморфизмом и отличить временные изменения экспрессии генов, которые не сохраняются при делении клеток, от длительно сохраняющихся ЭМ. Существуют несколько подходов для изучения роли ЭМ в проявлении поливариантности развития, имеющих разную степень доказательности (табл. 1).

Первый подход основан на изучении геномов, метиломов и транскриптомов у генетически идентичных рекомбинантных имбредных линий (epiRIL) арабидопсис (*A. thaliana*), отличающихся только эпигеномами. Получены epiRIL путем скрещивания растений экотипа Col с растениями того же экотипа, но с мутацией в одном из генов – регуляторов метилирования ДНК (Johannes et al., 2009; Reinders et al., 2009). Эти мутации приводят к снижению уровня метилирования генома – почти полному при мутации *met1* и ~70% при мутации *ddm1*, что вызывает изменение экспрессии генов и активацию мобильных элементов (Kakutani et al., 1995; Zhang et al., 2006; Lister et al., 2008). Самоопыление F1 и последующий имбридинг потомков F2 путем посева в каждом поколении всего одного семени привел к созданию линий, гомозиготных по дифференциально метилированным участкам генома (ДМУ), которые стабильно сохраняются в течение многих поколений. Растения F2 с мутацией (*met1* или *ddm1*) убирают из популяции. Поэтому полученные в результате имбридинга (до 9 поколений) epiRIL в результате рекомбинаций имеют разные эпигеномы, но практически идентичные геномы. Немногочисленные генетические изменения, возникающие в результате спонтанных мутаций и активации мобильных элементов на фоне общего снижения уровня метилирования ДНК (Miura et al., 2001; Mirouze et al., 2009; Marí-Ordóñez et al., 2013), выявляют секвенированием генома. Благодаря рекомбинации хромосом, которая позволяет использовать принципы генетического картирования, выявляют ДМУ генома, которые обусловливают фенотипические различия между линиями, изменяя экспрессию генов. Для этого линии группируют по фенотипическим показателям (например, линии рано- и поздноцветущие) и сравнивают группы по распределению ДМУ в геномах разных групп epiRIL. Как правило, для одного признака обнаруживаются несколько ДМУ из разных хромосом (как при картировании локусов количественных признаков QTL). Анализ таких epiQTL, определение положения 5mC относительно рядом локализованных генов, вместе с анализом генома и транскриптома может обнаружить эпиаллели, которые изменяют уровень транскрипцию из-за ЭМ и обусловливают фенотипические различия между линиями.

Многочисленные эксперименты с epiRIL показывают, что стабильные ЭМ обусловливают различия по морфологическим признакам (Johannes et al., 2009; Roux et al., 2011; Zhang et al., 2013; Cortijo et al., 2014), продуктивности (Latzel et al., 2013), устойчивости растений к разнообразным стрессовым воздействиям, включая патогены (Zhang et al., 2013; Latzel et al., 2013; Furci et al., 2019; Liégard et al., 2019), по реакции на экзогенные гормоны (Latzel et al., 2012) и по содержанию метаболитов (Kooke et al., 2019).

Эксперименты с epiRIL доказали, что ЭМ могут быть важным источником фенотипических изменений. Однако сегодня этот подход практически исчерпал себя: морфологические изменения между разными имбредными линиями не велики, и исследования большинства признаков уже проведено. Поскольку уровень и спектр ЭМ определяется не столько внешними воздействиями, сколько генетическими различиями (аллельным составом генов – эпигенетических регуляторов), создание epiRIL на основе разных экотипов могло бы расширить фенотипическое разнообразие линий и возможности анализа. Однако у арабидопсис есть и еще одно важное ограничение (Alonso et al., 2015). Растение имеет компактный геном с небольшой долей повторяющихся последовательностей и с самым низким средним уровнем метилирования генома (5% 5mC) по сравнению с другими покрытосеменными растениями (у риса и кукурузы % 5mC составляет 16 и 27%). Следовательно, этот объект далеко не идеален для изучения роли ЭМ в фенотипической изменчивости, хотя именно в исследованиях на арабидопсис открыты все основные гены – ЭР.

Второй подход базируется на исследованиях немодельных видов растений, которые имеют клоновое происхождение (клоны инвазивных видов, клоны культурных растений), что также гарантирует их генетическую идентичность, но не исключает эпигенетические различия. Для подтверждения связи фенотипа с ЭМ анализируют уровень и особенности метилирования генома. Чаще всего используют MSAP-анализ (methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism), т.е. анализируют спектр амплифицированных фрагментов ДНК, полученных с использованием пары рестриктаз (часто *Hpa*II и *Msp*I), которые узнают одну последовательность, но обладают разной чувствительностью к присутствию 5mC (Reyna-Lopez et al., 1997). В отдельных случаях используют высокоразрешающую жидкостную хроматографию гидролизованной ДНК (HPLC), иммуноцитохимический анализ хроматина на присутствие 5mC, полногеномное бисульфитное секвенирование, а также другие методы (Kurdyukov, Bullock, 2016).

Результаты большинства исследований, проведенных на клонах инвазивных растений, а также на успешных видах, сочетающих вегетативное размножение с половым, подтвердили, что у таких видов уровень эпигенетической изменчивости существенно превышает генетический и является важным (Gao et al., 2010; Richards et al., 2012; Spens, Douhovnikoff, 2016; Guarino et al., 2019), а иногда и практически единственным источником адаптивной изменчивости (Shi et al., 2019). Эти данные свидетельствуют о том, что адаптивные эпигенетические изменения, которые сохраняются при вегетативном размножении (Rendina González et al., 2018; Shi et al., 2019), обеспечивают дивергенцию и успешную экспансию многих инвазивных видов в разные эколого-географические зоны (Verhoeven, Preite, 2014; Douhovnikoff, Dodd, 2015; Latzel et al., 2016; Münzbergová et al., 2019). Сходные результаты получены в исследованиях растений пирамидального тополя и банана, которые имеют единое клоновое происхождение, но культивируются в разных эколого-географических условиях (Vanden Broeck et al., 2018; Kitavi et al., 2020). В исследованиях паттерна метилирования ДНК восточно-африканских сортов банана, различавшихся по морфологическим признакам, показано сохранение части MSAP-маркеров метилирования ДНК и при половом размножении (Kitavi et al., 2020).

Сегодня много экспериментальных работ и обзоров посвящены анализу роли эпигенетической памяти в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам (Ashapkin et al., 2020; Ueda, Seki, 2020; Oberkofler et al., 2021; Srikant, Drost, 2021). Онтогенетическим признакам в этих исследованиях уделяется мало внимания. Однако есть экспериментальные работы, выполненные на будре (Quan et al., 2021) *Glechoma longituba* (Lamiaceae) и землянике *Fragaria vesca* (Rosaceae) (Latzel, Münzbergová, 2018), в которых исследовали число, общую массу, площадь листа и, самое интересное – направление роста вегетативных побегов после воздействия на материнское растение разных условий освещения (света, затемнения, УФ-облучения) и питания (обычный субстрат и обогащенный NH_4, NO_3, P, K, Mg, Ca) или сочетания разных воздействий. Наблюдая за развитием рамет (вегетативных побегов, которые должны дать начало новому организму), авторы пытались узнать, способны ли растения при формировании рамет "учитывать" прошлый опыт и формировать раметы в том направлении, которое оптимально для развития потомков.

Эта работа и другие иследования "интеллекта растений" подвергаются критике – статистические данные экспериментов и их интерпретация не всегда убедительны (Mallatt et al., 2021). Тем не менее, исследование таких клоновых систем очень интересно. Формируя сложные сети из десятков и сотен взаимодействующих полуавтономных рамет, клоны могут оказываться эпигенетическими мозаиками (González et al., 2016). Такой факультативный эпигенетический мозаицизм (связанный не с направлением дифференцировки тканей, а с действием условий среды) может возникать из-за того, что разные части сети могут оказываться в разных условиях и иметь разный эпигенотип, адаптированный к определенному воздействию. Эксперименты на таких клонах могут оценить роль факультативного эпигенетического мозаицизма в поддержании жизнеспособности всего клона и исследовать возможность обмена эпигенетической информацией разными частями клона. В качестве мобильных эффекторов ЭМ могут рассматриваться малые РНК (miРНК и siРНК), участвующие в РНК-зависимом метилировании ДНК и способные передвигаться между побегом и корнем одного растения по плазмодесмам и по флоэме (Tamiru et al., 2018; Pagliarani, Gambino, 2019).

Третий основан на изучении единичных растений. Анализируют изменения онтогенеза органов при разных воздействиях или анализируют разные части одного растения, которые находятся под воздействием разных микроусловий. Исследования показали, что факультативный эпигенетический мозаицизм выявляется не только у вегетативно размножающихся растений. Различия по уровню и особенностям метилирования ДНК обнаружены и между разными частями отдельных растений дикой лаванды *Lavandula latifolia* (*Lamiaceae*) (Alonso et al., 2018; Herrera et al., 2021), падуба остроли́стного *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) (Herrera, Bazaga, 2013), тополя волосистоплодного *Populus trichocarpa* (Salicaceae) (Hofmeister et al., 2020). Хотя различия не велики (между ветвями лаванды различие было по 6–8% MSAP-маркеров по данным Herrera et al., 2021), они свидетельствуют об относительной автономности разных частей многолетних растений. Эти различия могут являться следствием разного воздействия окружающих условий (доступность света, повреждение патогенами, животными и пр.) и зависеть от пространственно-временных характеристик развития того или иного модуля.

Яркое свидетельство связи факультативного эпигенетического мозаицизма и морфогенеза листа получено при изучении многолетних древесных растений падуба остролистого *Ilex aquifolium* (Herrera, Bazaga, 2013). Для падуба характерна гетерофилия – наличие на одном растении как простых цельнокрайных, так и лопастных листьев с шипами по краю (колючие). Причем ветки растений, которые объедаются оленями и козами, гораздо чаще содержат колючие листья (76% веток), чем ветки неповрежденных деревьев (19%). Кроме того, чем ниже ветки расположены, тем чаще они содержат колючие листья ($r_s = -0.698$), что авторы объясняют большей досягаемостью таких веток для животных, т.е. развитие шипов на листьях – это ответ растения на повреждение растений животными (Herrera, Bazaga, 2013). MSAP-анализ листьев разной морфологии с одних и тех же веток показал, что геном цельнокрайних листьев метилирован сильнее, чем колючих листьев. Эти результаты свидетельствуют о том, что ЭМ (в данном случае – изменения уровня метилирования генома) могут обусловить адаптивные изменения программы онтогенеза листьев. Они также показывают, что факультативный эпигенетический мозаицизм может становиться основным фактором вариации морфологии модулей в пределах одного растения и, возможно, фактором эпигенетического разнообразия потомков одного растения (Herrera, 2017). В отличие от конститутивного эпигенетического мозаицизма, который связан с реализацией генетических программ развития вида, с поддержанием идентичности органов и тканей внутри растения, факультативный эпигенетический мозаицизм отражает возможность адаптивного изменения этих программ в отдельных модулях растения в ответ на воздействие внешних условий.

Гетерофилия особенно распространена среди водных растений. Листья, расположенные над водой и под водой, могут качественно различаться по форме, анатомическим и функциональным особенностям. Погруженные в воду листья как правило более рассеченные, чем надводные. Исследования более 20 видов растений с гетерофилией выявили основные внешние факторы (погруженность, температура) и внутренние факторы (гормоны), определяющие тип формирующегося листа (обзоры Nakayama et al., 2017; Li et al., 2019, 2021; van Veen, Sasidharan, 2021). Одно из первых исследований связи уровня метилирования ДНК с гетерофилией выполнено на водяном орехе *Trapa natans* (Lythraceae), имеющем сильно рассеченные подводные листья. С использованием иммуно-цитохимического определения 5mC показан более низкий уровень метилирования ДНК в почках, дающих начало рассеченным листьям по сравнению с почками, из которых формируются цельнокрайние листья надводной части (Bitonti et al., 1996). Эти результаты сходны с результатами исследований колючих листьев падуба (Herrera, Bazaga, 2013) и также указывает на существововании факультативного эпигенетического мозаицизма и его роль в проявлении гетерофилии.

Рассмотренные примеры показывают, что 2-ой и 3-ий подходы, в отличие от 1-ого, не позволяет выявить те конкретные дифференциально метилированные участки (ДМУ) генома, которые обусловливают изменения фенотипа. Однако по мере углубления знаний о генетическом контроле онтогенеза будут появляться новые возможности, связанные с тестированием уровня экспрессии и профиля метилирования не всего генома, а ключевых консервативных генов, изменения работы которых потенциально могут обусловливать похожий фенотип. Примером таких исследований является анализ влияния водного дефицита на развитие устьиц на листьях растений арабидопсис (Tricker et al., 2012). Показано, что в этих условиях наблюдается гиперметилирование гена *SPCH*, который контролирует развитие устьиц. Это приводило к уменьшению их числа на листе. Высокий уровень метилирования ДНК гена *SPCH* и сниженное число устьиц наследовался потомкам (Tricker et al., 2013).

Одной из наиболее полно изученных и консервативных генетических программ сегодня является программа развития листа (Fritz et al., 2018; Satterlee, Scanlon, 2019).) В этой связи, особенно хорошие перспективы открываются для изучения генетических и эпигенетических основ гетерофилии. Анализ экспрессии генов, играющих центральную роль в консервативных генетических программах развития листа, был проведен на 2 видах гетерофильных растений (Nakayama et al., 2014; Li et al., 2017; Kim et al., 2018). У растений *Rorippa aquatica* (Brassicaceae) (Nakayama et al., 2014) и *Hygrophila difformis* (Acanthaceae) (Li et al., 2017) рассеченность погруженных листьев оказалась результатом активации в примордиях листьев высококонсервативных генов, которые поддерживают плюрипотентность клеток листа. Это гены класса *KNOX I*, экспрессия которых поддерживает деление клеток и определяет возможность усложнения структуры листа (Blein et al., 2008). У обоих видов эти гены не работают в надводных цельнокрайних листьях, но экспрессируются при развитии рассеченных (Nakayama et al., 2014; Li et al., 2017). Хотя в этих работах нет анализа метилированиия ДНК или модификации гистонов в листьях разного типа, можно предполагать, что именно эпигенетическая регуляция *KNOX I*-генов под влиянием условий среды лежит в основе гетерофилии. Гены *KNOX I* – известная мишень эпигенетической регуляции (Lodha et al., 2008; Gaillochet, Lohmann, 2015). Поэтому, нет сомнений, что в регуляторных участках *KNOX I*- генов этих видов можно выявить репрессивные метки в надводных листьев и их отсутствие – в погруженных. В этих исследованиях показано, что главным внешним фактором, вызывающим изменение морфологии листьев, является температура. Понижение температуры с 26 до 20°С достаточно, чтобы растение начинало формировать рассеченные листья вместо цельных. Поэтому *R. aquatica* и *H. difformis* являются идеальными моделями для будущих исследований динамики эпигенетических модификаций в *KNOX I*-генах при изменении внешних условий. Возможно, именно эти модели позволят расшифровать последовательность молекулярных событий, которые запускаются внешними воздействиями и прямо или опосредованно активируют или блокируют работу генов, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию генов *KNOX I*.

Отметим, что помимо гетерофилии у растений есть и другие примеры качественных разлий морфологии органов у одного вида или у одного и того же растения – полигамия, гетерокарпия, диаспория. Изучению генетических и эпигенетических основ полигамии у растений будет посвящен отдельный обзор. Работ по изучению роли ЭМ в проявлении гетерокарпии и диаспории автору обнаружить не удалось.

Четвертый подход основан на анализе внутривидового фенотипического полиморфизма. При работе с немодельными видами определить истинные причины фенотипических различий сложно из-за наличия внутривидового генетического полиморфизма. Поэтому упомянем лишь одну из работ, которая выполнена на мангровых деревьях *Laguncularia racemosa* (Combretaceae), произрастающих в приливно-отливной полосе морских побережий и устьях рек (Lira-Medeiros et al., 2010). Растения с участков с высоким засолением отличаются от тех, что растут в благоприятных условиях по многим морфологическим показателям, среди которых самые яркие различия наблюдались по высоте (соответственно, до 3 и до 40 м). Анализ генетической (AFLP-анализ – amplified fragment length polymorphism) и эпигенетической (MSAP-анализ) изменчивости показал, что популяции растений с разных участков различаются как по генетическим, так и по эпигенетическим маркерам, хотя уровень изменчивости между популяциями по эпигенетическим маркерам был выше. Кроме того, выявлен более низкий уровень метилирования ДНК у растений с засоленных участков по сравнению с растущими в более благоприятных условиях (Lira-Medeiros et al., 2010). Хотя эти данные указывают на возможную важную роль ЭМ в адаптации растений к разным условиям существования, они не доказывают существование связи между фенотипом и выявленными изменениями уровня метилирования ДНК.

Для подтверждения связи фенотипических различий с ЭМ анализируют фенотипические изменения между линиями на фоне использования ингибиторов метилирования ДНК 5-азацитидина или зебуралина (см. например, Alonso et al., 2017; Münzbergová et al., 2018; Машкина, Табацкая, 2020). При исчезновении или сглаживании фенотипических различий делается заключение об участии эпигенетических механизмов в их появлении в исходных популяциях. Однако действие этих ингибиторов может нарушать развитие растений и затруднять трактовку результатов. Таким образом, исследования, выполненные на природных (не клоновых) популяциях, в которых всегда имеется генетический полиморфизм, не могут исключить его определяющего влияния на любые фенотипические признаки.

Эту проблему помогают решить постоянно расширяющиеся возможности широкомасштабного анализа геномов, метиломов и транскриптомов. Сегодня они успешно реализуются не только на арабидопсис, но и на дикорастущих и культурных растениях с использованием разных подходов (обзор Gahlaut et al., 2020). В исследованиях на образцах дикорастущих и коллекционных растений, на сортах и имбредных линиях культурных растений выявлены ДМУ генома, ассоциированные с определенным фенотипическим признаком, а в некоторых случаях – выявлены гены-кандидаты, которые локализованы рядом с этими ДМУ и изменяют свою экспрессию (Ha et al., 2020; Lu et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря использованию разнообразных подходов для изучения роли эпигенетических механизмов в поливариантности развития растений сегодня экспериментально доказаны следующие положения: (1) условия среды произрастания, стрессовые воздействия вызывают изменение эпигенома; часть возникающих ЭМ адаптивна; (2) эпигенетические изменения наследуются при сохранении условий, вызвавших изменения; примерно половина ЭМ стабильно передается потомкам в соответствие с законами Менделя; (3) при изменении условий прежние ЭМ постепенно исчезают, хотя уровень стабильности разных ЭМ различен; (4) внутривидовая морфологическая изменчивость растений обусловлена не только генетическим полиморфизмом, но и эпигенетическими различиями между растениями; (5) многие морфологические и физиолого-биохимические признаки, отличающие разные части одного растения – результат факультативного эпигенетического мозаицизма, который возникает из-за различий микроусловий, воздействующих на разные части растения.

Эти положения указывают на существование у растений уникальных особенностей функционирования эпигенетических механизмов. Действительно, работа ЭР у растений находится под контролем условий окружающей среды. Воздействие окружающей среды может быть не специфическим (за счет снижения уровня доноров метильных групп) и специфическим, основанном на активации экспрессии отдельных генов – ЭР и их воздействии на определенные гены-мишени. Эти и другие рассмотренные в обзоре механизмы могут обусловливать изменение экспрессии определенных групп генов и объяснять адаптивность ЭМ. Сохранение адаптивных ЭМ у потомков обеспечивается поддерживающими метилтрансферазами и положительными обратными взаимодействиями между разными эпигенетическими метками. На работу уже известных ЭР могут влиять и недавно открытые специфические для растений гены. Продукты этих генов могут либо нарушать, либо активировать работу ЭР. Нет сомнения, что у растений будут открыты и новые ЭР, влияющие на динамику ЭМ, поскольку даже у арабидопсис до сих пор не известна функция ~30% генов ядерного генома.

Исследований эпигенетических основ внутривидовой фенотипической изменчивости становится все больше, однако даже при “омиксном” исполнении, требуются дополнительные подтверждения того, что выявленные ассоциации между фенотипом и эпиаллелями генов-кандидатов обусловлены причинно-следственными связями. Сегодня разрабатываются новые подходы для таких подтверждений. Используя специальные системы для эпигенетического редактирования геномов, можно с их помощью привлекать белки – ЭР к генам-кандидатам, и изучать влияние этих модификаций на фенотип (Gallego-Bartolomé et al., 2020; Fal et al., 2021; Selma, Orzáez, 2021). Омиксные подходы и биотехнологии направленного управления эпигенетическими процессами открывают новые перспективы в изучении научных основ пластичности развития растений и практическом использовании наследуемых ЭМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 19-04-00149 и № 20-14-50020).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания выполненных авторами исследований с использованием животных в качестве объектов и с участием людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Альберт Е.В., Ежова Т.А. Стволовые клетки побега растений – генетическая регуляция // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 149–163.

Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42. № 9. С. 1186–1199.

Ежова Т.А., Куприянова Е.В. Изучение роли ауксина в регуляции развития эктопических выростов на листьях мутанта *taeniata Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2019. Т. 50. С. 312–318.

Жукова Л.А., Глотов Н.В. Морфологическая поливариантность онтогенеза в природных популяциях растений // Онтогенез. 2001. № 6. С. 455–461.

Калинкина В.А. Поливариантность онтогенеза представителей рода *Trifolium* L. секции Lupinaster (Fabr.) Ser. // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 2. С. 172–180.

Кольцов Н.К. Взгляды Лотси на эволюцию организмов // Природа. 1915. № 10. С. 1253. (Цитировано по Раменский, 2018).

Куприянова Е.В., Денисов Е.Р., Байер М.А., Ежова Т.А. Различия в проявлении плюрипотентности клеток *in vivo* и *in vitro* у мутанта *Arabidopsis thaliana* с фенотипом нарушения клеточной памяти // Физиология растений. 2021. Т. 68. № 1. С. 53–62.

Машкина О.С., Табацкая Т.М. Морфогенез рассеченного листа березы в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 6. С. 460–472.

Нотов А.А., Жукова Л.А. Концепция поливариантности онтогенеза и современная эволюционная морфология // Известия РАН, серия биологическая. 2019. № 1. С. 1–9.

Разин С.В., Быстрицкий А.А. Хроматин: упакованный геном. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 176 с.

Раменский Е.В. Эпигенетика: Уоддингтон или Кольцов? // Онтогенез. 2018, Т. 49. № 6. С. 391–396.

Серебряков И.Г., Серебрякова Т.И. Некоторые вопросы эволюции жизненных форм цветковых растений // Ботан. журн. 1972. Т. 57. № 5. С. 417–433.

Тиходеев О.Н. Эпигенетические и эугенетические процессы // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 6. С. 542–553.

Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. Эпигенетика. Издательство Техносфера. 2010. 496 с.

Aichinger E., Villar C.B.R., Farrona S. et al. CHD3 proteins and polycomb group proteins antagonistically determine cell identity in *Arabidopsis* // PLoS Genet. 2009. V. 5. P. e1000605.

Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control // Nature Rev. Genet. 2016. V. 17. № 8. P. 487–500.

Alonso C., Medrano M., Pérez R. et al. Tissue-specific response to experimental demethylation at seed germination in the non-model herb *Erodium cicutarium* // Epigenomes. 2017. V. 1. P. 16.

Alonso C., Pérez R., Bazaga P. et al. Within-plant variation in seed size and inflorescence fecundity is associated with epigenetic mosaicism in the shrub *Lavandula latifolia* (Lamiaceae) // Annals of Botany. 2018. V. 121. № 1. P. 153–160.

Alonso C., Pérez R., Bazaga P., Herrera C.M. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms // Front. Genet. 2015. V. 6. P. 4.

Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 20. P. 7457.

Baubec T., Dinh H.Q., Pecinka A. et al. Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 34–47.

Berger S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription // Nature. 2007. V. 447. P. 407–412.

Bernatavichute Y.V., Zhang X., Cokus S. et al. Genomewide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* // PLoS One. 2008. V. 3. P. e3156.

Birnbaum K.D., Roudier F. Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants // Regeneration. 2016. V. 4. P. 15–20.

Blein T., Pulido A., Vialette-Guiraud A. et al. A conserved molecular framework for compound leaf development // Science. 2008. V. 322. № 5909. P. 1835–1839.

Bloomer R.H., Hutchison C.E., Bäurle I. et al. The *Arabidopsis* epigenetic regulator ICU11 as an accessory protein of Polycomb Repressive Complex 2 // PNAS. 2020. V. 117. № 28. P. 16660–16666.

Bratzel F., López-Torrejón G., Koch M. et al. Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination // Curr. Biol. 2010. V. 26. № 20. P. 1853–1859.

Bitonti M.B., Cozza R., Wang G. et al. Nuclear and genomic changes in floating and submerged buds and leaves of heterophyllous waterchestnut (*Trapa natans*) // Physiologia Plantarum. 1996. V. 97. № 1. P. 21–27.

Bondada R., Somasundaram S., Marimuthu M.P. et al. Natural epialleles of *Arabidopsis SUPERMAN* display superwoman phenotypes // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 1. P. 772.

Bowman J.L., Sakai H., Jack T. et al. SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis* // Development. 1992. V. 114. P. 599–615.

Bräutigam K., Cronk Q. DNA Methylation and the evolution of developmental complexity in plants // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. 1447.

Catoni M., Griffiths J., Becker C. et al. DNA sequence properties that predict susceptibility to epiallelic switching // EMBO J. 2017. V. 36. P. 617–628.

Charbonnel C., Niazi A.K., Elvira-Matelot E. et al. The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 11891–11907.

Chen J., Liu J., Jiang J. et al. F-box protein CFK1 interacts with and degrades *de novo* DNA methyltransferase in *Arabidopsis* // New Phytol. 2021. V. 229. № 6. P. 3303–3317.

Chen D., Molito A., Liu C. et al. The *Arabidopsis* PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth // Cell Res. 2010. V. 20. P. 1332–1344.

Chen X., Ding A.B., Zhong X. Functions and mechanisms of plant histone deacetylases // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. P. 206–216.

Colicchio J., Kelly J., Hileman L. Mimulus sRNAs Are wound responsive and associated with transgenerationally plastic genes but rarely both // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 20. P. 7552.

Cortijo S., Wardenaar R., Colomé-Tatché M. et al. Mapping the epigenetic basis of complex traits // Science. 2014. V. 343. P. 1145–1148.

Couturier J., Chibani K., Jacquot J.P., Rouhier N. Cysteine-based redox regulation and signaling in plants // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 105.

Cubas P., Vincent C., Coen E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry // Nature. 1999. V. 401. P. 157–161.

Derkacheva M., Hennig L. Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants // J. Exp. Botany. 2014. V. 65. № 10. P. 2769–2784.

Douhovnikoff V., Dodd R.S. Epigenetics: a potential mechanism for clonal plant success // Plant Ecology. 2015. V. 216. P. 227–233.

Du J., Johnson L.M., Jacobsen S.E., Patel D.J. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2015. V. 16. P. 519–532.

Duan C.G., Wang X., Zhang L. et al. A protein complex regulates RNA processing of intronic heterochromatin-containing genes in *Arabidopsis* // PNAS. 2017. V. 114. № 35. P. E7377–E7384.

Duan C.G., Wang X.G., Tang K. et al. MET18 connects the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to active DNA demethylation in *Arabidopsis* // PLoS Genet. 2015. V. 11. P. e1005559.

Duan C.G., Wang X., Xie S. et al. A pair of trans poson-derived proteins function in a histone acetyltransferase complex for active DNA demethylation // Cell Res. 2016. V. 27. № 2. P. 226–240.

Duempelmann L., Skribbe M., Bühler M. Small RNAs in the transgenerational inheritance of epigenetic information // Trends Genet. 2020. V. 36. P. 203–214.

Erdmann R.M., Picard C.L. RNA-directed DNA methylation // PLoS Genet. 2020. V. 16. № 10. P. e1009034.

Fal K., Tomkova D., Vachon G. et al. Chromatin manipulation and editing: Challenges, new technologies and their use in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 2. P. 512.

Fedotov A.P., Ezhova T.A., Timonin A.C. Bizarre lamina margins in *tae* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) // Wulfenia. 2017. V. 24. P. 163–170.

Fenley A.T., Anandakrishnan R., Kidane Y.H., Onufriev A.V. Modulation of nucleosomal DNA accessibility via chargealtering post-translational modifications in histone core // Epigenet Chromatin. 2018. V. 11. № 1. P. 11.

Fletcher J.C. State of the art: trxG factor regulation of post-embryonic plant development // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1925.

Förderer A., Zhou Y., Turck F. The age of multiplexity: recruitment and interactions of Polycomb complexes in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2016. V. 29. P. 169–178.

Foyer C.H., Noctor G. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? // Plant, Cell and Environment. 2016. V. 39. P. 951–964.

Fritz M.A., Rosa S., Sicard A. Mechanisms underlying the environmentally induced plasticity of leaf morphology // Front. Genet. 2018. V. 9. P. 478.

Fultz D., Choudury S.G., Slotkin R.K. Silencing of active transposable elements in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 27. P. 67–76.

Furci L., Jain R., Stassen J. et al. Identification and characterisation of hypomethylated DNA loci controlling quantitative resistance in *Arabidopsis* // eLife. 2019. V. 8. P. e40655.

Gahlaut V., Zinta G., Jaiswal V., Kumar S. Quantitative epigenetics: A new avenue for crop improvement // Epigenomes. 2020. V. 4. № 4. P. 25.

Gaillochet C., Lohmann J.U. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity // Development. 2015. V. 142. № 13. P. 2237–2249.

Gallego-Bartolomé J., Liu W., Kuo P.H. et al. Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis* // Cell. 2019. V. 176. № 5. P. 1068–1082.

Gallego-Bartolomé J. DNA methylation in plants: mechanisms and tools for targeted manipulation // New Phytologist. 2020. V. 227. P. 38–44.

Gao L.X., Geng Y.P., Li B. et al. Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation // Plant Cell and Environment. 2010. V. 33. P. 1820–1827.

González R.A.P., Chrtek J., Dobrev P.I. et al. Stress-induced memory alters growth of clonal off spring of white clover

(*Trifolium repens*) // Am. J. Bot. 2016. V. 103. P. 1567–1574.

Gouil Q., Baulcombe D.C. DNA methylation signatures of the plant chromomethyltransferases // PLoS Genet. 2016. V. 12. № 12. P. e1006526.

Grimanelli D., Ingouff M. DNA methylation readers in plants // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. P. 1706–1717.

Guarino F., Heinze B., Castiglione S., Cicatelli A. Epigenetic analysis through MSAP-NGS coupled technology: the case study of white poplar monoclonal populations/stands // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 19. P. 7393.

Guo X., Xie Q., Li B., Su H. Molecular characterization and transcription analysis of DNA methyltransferase genes in tomato (*Solanum lycopersicu*m) // Genet. Mol. Biol. 2020. V. 43. № 1. P. e20180295.

Ha J., Kwon H., Cho K.H. et al. Identification of epigenetic variation associated with synchronous pod maturity in mungbean (*Vigna radiata* L.) // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 17414.

Hallé F. Modular growth in seed plants // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1986. V. 313. P. 77–88.

Handa V., Jeltsch A. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J. Mol. Biol. 2005. V. 348. P. 1103–1112.

Harris C.J., Scheibe M., Wongpalee S.P. et al. A DNA methylation reader complex that enhances gene transcription // Science. 2018. V. 362. P. 1182–1186.

Harvey Z.H., Chen Y., Jarosz D.F. Protein-based inheritance: epigenetics beyond the chromosome // Mol. Cell. 2018. V. 69. P. 195–202.

Hasegawa J., Sakamoto T., Fujimoto S. et al. Auxin decreases chromatin accessibility through the TIR1/AFBs auxin signaling pathway in proliferative cells // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 7773.

Hauser M.T., Aufsatz W., Jonak C., Luschnig C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants // Biochimica Et Biophysica Acta. 2011. V. 1809. P. 459–468.

He Y., Li Z. Epigenetic environmental memories in plants: establishment, maintenance, and reprogramming // Trends Genet. 2018. V. 34. P. 856–866.

Heard E., Martienssen R.A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms // Cell. 2014. V. 157. P. 95–109.

Henderson I.R., Jacobsen S.E. Epigenetic inheritance in plants // Nature. 2007. V. 447. P. 418–424.

Herms D.A., Mattson W.J. The dilemma of plants: to grow or defend // Q. Rev. Biol. 1992. V. 67. P. 283–335.

Herrera C.M. The ecology of subindividual variability in plants: Patterns, processes, and prospects // Web Ecology. 2017. V. 17. № 2. P. 51–64.

Herrera C. M., Bazaga P. Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees // Bot. J. Linn. Soc. 2013. V. 171. P. 441–452.

Herrera C.M., Bazaga P., Pérez R., Alonso C. Lifetime genealogical divergence within plants leads to epigenetic mosaicism in the shrub *Lavandula latifolia* (Lamiaceae) // New Phytol. 2021.

Hofmeister B.T., Denkena J., Colomé-Tatché M. et al. A genome assembly and the somatic genetic and epigenetic mutation rate in a wild long-lived perennial *Populus trichocarpa* // Genome Biol. 2020. V. 21. P. 259.

Hofmeister B.T., Lee K., Rohr N.A. et al. Stable inheritance of DNA methylation allows creation of epigenotype maps and the study of epiallele inheritance patterns in the absence of genetic variation // Genome Biol. 2017. V. 18. № 1. P. 155.

Huot B., Yao J., Montgomery B.L., He S.Y. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness // Molecular Plant. 2014. V. 7. № 8. P. 1267–1287.

Irish V.F. Cell lineage in plant development // Curr. Opin. Cell Biol. 1991. V. 3. P. 983–987.

Jablonka E., Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution // Q. Rev. Biol. 2009. V. 84. P. 131–176.

Jacobsen S.E., Meyerowitz E.M. Hypermethylated *SUPERMAN* epigenetic alleles in *Arabidopsis* // Science. 1997. V. 277. № 5329. P. 1100–1103.

Jmii S., Cappadocia L. Plant SUMO E3 ligases: Function, structural organization, and connection with DNA // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 652170.

Johannes F., Porcher E., Teixeira F.K. et al. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits // PLoS Genet. 2009. V. 5. P. e1000530.

Johannes F., Schmitz R.J. Spontaneous epimutations in plants // New Phytol. 2019. V. 221. P. 1253–1259.

Kakutani T. Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations // Plant Cell Physiol. 2002. V. 43. Iss. 10. P. 1106–1111.

Kakutani T., Jeddeloh J.A., Richards E.J. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 130–137.

Kim J., Joo Y., Kyung J. et al. A molecular basis behind heterophylly in an amphibious plant // PLoS Genet. 2018. V. 14. № 2. P. e1007208.

Kim D.H., Xi Y., Sung S. Modular function of long noncoding RNA, *COLDAIR*, in the vernalization response // PLoS Genet. 2017. V. 13. P. 1–18.

Kishimoto N., Sakai H., Jackson J. et al. Site specificity of the *Arabidopsis* METI DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus // Plant Mol. Biol. 2001. V. 46. № 2. P. 171–183.

Kitavi M., Cashell R., Ferguson M. et al. Heritable epigenetic diversity for conservation and utilization of epigenetic germplasm resources of clonal East African Highland banana (EAHB) accessions // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 2605–2625.

Kong X., Hong Y., Hsu Yi-F. et al. SIZ1-Mediated SUMOylation of ROS1 enhances its stability and positively regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis* // Mol Plant. 2020. V. 13. № 12. P. 1816–1824.

Kooke R., Morgado L., Becker F. et al. Epigenetic mapping of the *Arabidopsis* metabolome reveals mediators of the epigenotype-phenotype map // Genome Res. 2019. V. 29. № 1. P. 96–106.

Kribelbauer J.F., Lu X.J., Rohs R. et al. Toward a mechanistic understanding of DNA methylation readout by transcription factors // J. Mol. Biol. 2019. V. 432. Iss. 6. P. 1801–1815.

Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method // Biology (Basel). 2016. V. 5. № 1. P. 3.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // Cell. 2007. V. 128. P. 693–705.

Lämke J., Bäurle I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants // Genome Biol. 2017. V. 18. № 1. P. 124.

Lardon R., Geelen D. Natural variation in plant pluripotency and regeneration // Plants (Basel). 2020. V. 9. № 10. P. 1261.

Latzel V., Allan E., Silveira A. B. et al. Epigenetic diversity increases the productivity and stability of plant populations // Nature Commun. 2013. V. 4. P. 2875.

Latzel V., Münzbergová Z. Anticipatory behavior of the clonal plant *Fragaria vesca* //Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1847.

Latzel V., Rendina González A.P., Rosenthal J. Epigenetic memory as a basis for intelligent behavior in clonal plants // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1354.

Latzel V., Zhang Y., Karlsson Moritz K. et al. Epigenetic variation in plant responses to defence hormones // Annals of Botany. 2012. V. 110. № 7. P. 1423–1428.

Law J.A., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nature Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 204–220.

Le N.T., Harukawa Y., Miura S. et al. Epigenetic regulation of spurious transcription initiation in *Arabidopsis* // Nature Commun. 2020. V. 11. P. 3224.

Le Goff A., Allard P., Landecker H. Heritable changeability: Epimutation and the legacy of negative definition in epigenetic concepts // Studies in History and Philosophy of Sci. 2021. V. 86. P. 35–46.

Li G., Hu S., Yang J. et al. Water-Wisteria as an ideal plant to study heterophylly in higher aquatic plants // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 1225–1236.

Liégard B., Baillet V., Etcheverry M. et al. Quantitative resistance to clubroot infection mediated by transgenerational epigenetic variation in *Arabidopsis* // New Phytologist. 2019. V. 222. № 1. P. 468–479.

Li X., Harris C.J., Zhong Z. et al. Mechanistic insights into plant SUVH family H3K9 methyltransferases and their binding to context-biased non-CG DNA methylation // PNAS. 2018. V. 115. P. E8793–E8802.

Li J., Yang D.L., Huang H. et al. Epigenetic memory marks determine epiallele stability at loci targeted by de novo DNA methylation // Nature Plants. 2020. V. 6. P. 661–674.

Lindermayr C., Rudolf E.E., Durner J., Groth M. Interactions between metabolism and chromatin in plant models // Molecular Metabolism. 2020. V. 38. P. 100951.

Li B., Carey M., Workman J.L. The role of chromatin during transcription // Cell. 2007. V. 128. P. 707–719.

Li G., Hu S., Hou H., Kimura S. Heterophylly: Phenotypic plasticity of leaf shape in aquatic and amphibious plants // Plants. 2019. V. 8. P. 420.

Li G., Hu S., Zhao X. et al. Mechanisms of the morphological plasticity induced by phytohormones and the environment in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 2. P. 765.

Li G., Hu S., Yang J. et al. Water-Wisteria as an ideal plant to study heterophylly in higher aquatic plants // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 1225–1236.

Li S.W. Molecular bases for the regulation of adventitious root generation in plants // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 614072.

Li Y., Kumar S., Qian W. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development // Plant Cell Rep. 2018. V. 37. № 1. P. 77–85.

Li Y., Li H. Many keys to push: diversifying the 'readership' of plant homeodomain fingers // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2012. V. 44. № 1. P. 28–39.

Li J., Yang D.-L., Huang H. et al. Epigenetic memory marks determine epiallele stability at loci targeted by *de novo* DNA methylation // Nature Plants. 2020. V. 6. P. 661–674.

Liang S.C., Hartwig B., Perera P. et al. Kicking against the PRCs – A domesticated transposase antagonises silencing mediated by polycomb group proteins and is an accessory component of polycomb repressive complex 2 // PLoS Genet. 2015. V. 11. № 12. P. e1005660.

Liegard B., Baillet V., Etcheverry M. et al. Quantitative resistance to clubroot infection mediated by transgenerational epigenetic variation in *Arabidopsis* // New Phytol. 2019. V. 222. P. 468–479.

Lisch D. How important are transposons for plant evolution? // Nature Rev. Genet. 2013. V. 14. P. 49–61.

Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* // Cell. 2008. V. 133. P. 523–536.

Liu R., Lang Z. The mechanism and function of active DNA demethylation in plants // J Integr. Plant Biol. 2019. V. 62. P. 148–159.

Liu C., Lu F., Cui X., Cao X. Histone methylation in higher plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2010. V. 61. P. 395–420.

Locato V., Cimini S., De Gara L. ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: Epigenetic and retrograde control of gene expression // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 3373–3391.

Lu W., Xiao L., Quan M. et al. Linkage-linkage disequilibrium dissection of the epigenetic quantitative trait loci (epiQTLs) underlying growth and wood properties in *Populus* // New Phytol. 2020. V. 225. P. 1218–1233.

Lira-Medeiros C.F., Parisod C., Fernandes R.A. et al. Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment // PLoS One. 2010. V. 5. P. e10326.

Lodha M., Marco C.F., Timmermans M.C. Genetic and epigenetic regulation of stem cell homeostasis in plants // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2008. V. 73. P. 243–251.

Mallatt J., Blatt M.R., Draguhn A. et al. Debunking a myth: plant consciousness // Protoplasma. 2021. V. 258. № 3. P. 459–476.

Marí-Ordóñez A., Marchais A., Etcheverry M. et al. Reconstructing *de novo* silencing of an active plant retrotransposon // Nature Genet. 2013. V. 45. № 9. P. 1029–1039.

Mateo-Bonmatí E., David Esteve-Bruna D., Juan-Vicente L. et al. INCURVATA11 and *CUPULIFORMIS2* are redundant genes that encode epigenetic machinery components in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2018. V. 30. P. 1596–1616.

Matzke M.A., Mosher R.A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity// Nature Reviews Genet. 2014. V.15. P. 394–408.

Mirouze M., Reinders J., Bucher E. et al. Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis* // Nature. 2009. V. 461. P. 427–430.

Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K. et al. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis* // Nature. 2001. V. 411. № 6834. P. 212–214.

Morange M. The attempt of Nikolai Koltzoff (Koltsov) to link genetics, embryology and physical chemistry // J. Bioscience. 2011. V. 36. P. 211–214. Перевод: "Николай Кольцов и молекулярная биология" // Природа. 2015. № 12. С. 78–82.

Morgado L., Preite V., Oplaat C. et al. Small RNAs reflect grandparental environments in apomictic dandelion // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 2035–2040.

Münzbergová Z., Latzel V., Šurinová M., Hadincová V. DNA methylation as a possible mechanism affecting ability of natural populations to adapt to changing climate // Oikos. 2019. V. 128. P. 124–134.

Ma X., Lv S., Zhang C. et al. Histone deacetylases and their functions in plants // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. P. 465–478.

Manning K., Tör M., Poole M. et al. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening // Nature Genet. 2006. V. 38. № 8. P. 948–952.

Miura K., Agetsuma M., Kitano H. et al. A metastable *DWARF1* epigenetic mutant affecting plant stature in rice // PNAS. 2009. V. 106. № 27. P. 11218–11223.

Mozgova I., Hennig L. The polycomb group protein regulatory network // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 269–296.

Münzbergová Z., Latzel V., Šurinová M., Hadincová V. DNA methylation as a possible mechanism affecting ability of natural populations to adapt to changing climate // Oikos. 2019. V. 128. № 1. P. 124–134.

Muyle A., Shearn R., Marais G.A. The evolution of sex chromosomes and dosage compensation in plants // Genome Biol. Evol. 2017. V. 9. № 3. P. 627–645.

Muyle A., Zemp N., Fruchard C. et al. Genomic imprinting mediates dosage compensation in a young plant XY system // Nature Plants. 2018. V.4. № 9. P. 677–680.

Nakayama H., Nakayama N., Seiki S. et al. Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 4733–4748.

Nakayama H., Sinha N.R., Kimura S. How do plants and phytohormones accomplish heterophylly, leaf phenotypic plasticity, in response to environmental cues // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1717.

Narlikar G.J., Sundaramoorthy R., Owen-Hughes T. Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes // Cell. 2013. V. 154. P. 490–503.

Nashun B., Hill P.W., Hajkova P. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past // The EMBO Journal. 2015. V. 34. № 10. P. 1296–1308.

Noble D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics // J. Exp. Biol. 2015. V. 218. P. 816–818.

Oberkofler V., Pratx L., Bäurle I. Epigenetic regulation of abiotic stress memory: maintaining the good things while they last // Curr. Opin. Plant Biol. 2021. V. 8. № 61. P. 102007.

Oborny B. The plant body as a network of semi-autonomous agents: a review // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2019. V. 374. № 1774. P. 20180371.

O'Malley R.C., Ecker J.R. Epiallelic variation in *Arabidopsis thaliana* // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2012. V. 77. P. 135–145.

Ornelas-Ayala D., Garay-Arroyo A., García-Ponce B. et al. The epigenetic faces of ULTRAPETALA1 // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 637244.

Pagliarani C., Gambino G. Small RNA mobility: Spread of RNA silencing effectors and its effect on developmental processes and stress adaptation in plants // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 17. P. 4306.

Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. Active DNA demethylation in plants // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. P. 4683.

Patel D.J.A. Structural perspective on readout of epigenetic histone and DNA methylation marks // Cold Spring Harb. Perspectives Biol. 2016. V. 8. № 3. P. a018754.

Pikaard C.S., Scheid O.M. Epigenetic regulation in plants // Cold Spring Harb. Perspectives Biol. 2014. V. 6. № 12. P. a019315.

Poethig S. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants // Trends Genet. 1989. V. 5. P. 273–277.

Prakash S., Singh R., Lodhi N. Histone demethylases and control of gene expression in plants // Cell. Mol. Biol. 2014. V. 60. № 5. P. 97–105.

Ptashne M. Epigenetics: core misconcept // PNAS. 2013. V. 110. P. 7101–7103.

Quan J., Latzel V., Tie D. et al. Ultraviolet B radiation triggers DNA methylation change and affects foraging behavior of the clonal plant *Glechoma longituba* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 633982.

Raju S.K.K., Ritter E.J., Niederhuth C.E. Establishment, maintenance, and biological roles of non-CG methylation in plants // Essays in Biochemistry. 2019. V. 63. P. 743–755.

Reinders J., Wulff B.B.H., Mirouze M. et al. Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes // Genes Dev. 2009. V. 23. P. 939–950.

Rendina González A.P., Preite V., Verhoeven K.J.F., Latzel V. Transgenerational effects and epigenetic memory in the clonal plant *Trifolium repens* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1677.

Reyna-Lopez G.E., Simpson J., Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism // Mol. Genet. Genomics. 1997. V. 253. P. 703–710.

Richards C.L., Schrey A.W., Pigliucci M. Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with high epigenetic differentiation // Ecol. Lett. 2012. V. 15. P. 1016–1025.

Rohde A., Grunau C., De Beck L. et al. Carpel, a new *Arabidopsis* epi-mutant of the *SUPERMAN* gene: phenotypic analysis and DNA methylation status // Plant Cell Physiol. 1999. V. 40. № 9. P. 961–972.

Rohini G., Romika K., Sneha T., Shweta G. Genomic survey, gene expression analysis and structural modeling suggest diverse roles of DNA methyltransferases in legumes // PLoS One. 2014. V. 2. e88947.

Roudier F., Ahmed I., Berard C. et al. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis* // EMBO Journal. 2011. V. 30. P. 1928–1938.

Roux F., Colomé-Tatché M., Edelist C. et al. Genome-wide epigenetic perturbation jump-starts patterns of heritable variation found in nature // Genetics. 2011. V. 188. P. 1015–1017.

Saravana Kumar R.M., Wang Y., Zhang X. et al. Redox components: Key regulators of epigenetic modifications in plants // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. P. 1419.

Satterlee J.W., Scanlon M.J. Coordination of leaf development across developmental axes // Plants (Basel). 2019. V. 8. № 10. P. 433.

Scheid R., Chen J., Zhong X. Biological role and mechanism of chromatin readers in plant // Curr. Opin. Plant Biol. 2021. V. 10. № 61. P. 102008.

Schmitz R.J., Schultz M.D., Lewsey M.G. et al. Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants // Science. 2011. V. 334. № 6054. P. 369–373.

Selma S., Orzáez D. Perspectives for epigenetic editing in crops // Transgenic Res. 2021.

Seta A., Tabara M., Nishibori Y. et al. Post-translational regulation of the dicing activities of *Arabidopsis* DICER-LIKE 3 and 4 by inorganic phosphate and the redox state // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. P. 485–495.

Shi W., Chen X., Gao L. et al. Transient stability of epigenetic population differentiation in a clonal invader // Front. Plant Sci. 2019. V. 9. P. 1851.

Shin J., Bae S., Seo P.J. De novo shoot organogenesis during plant regeneration // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. № 1. P. 63–72.
https://doi.org/10.1093/jxb/erz395

Sijacic P., Holder D. H. Bajic M., Deal R.B. Methyl-CpG-binding domain 9 (MBD9) is required for H2A.Z incorporation into chromatin at a subset of H2A.Z-enriched regions in the *Arabidopsis* genome // PLoS Genetics. 2019. V. 15. № 8. P. 1008326.

Song Q., Chen Z.J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 24. P. 101–109.

Spens A.E., Douhovnikoff V. Epigenetic variation within *Phragmites australis* among lineages, genotypes, and ramets // Biological Invasions. 2016. V. 18. P. 2457–2462.

Srikant T., Drost H.G. How stress facilitates phenotypic innovation through epigenetic diversity // Front. Plant Sci. 2021. V. 11. P. 606800.
https://doi.org/10.3389/fpls.2020.606800

Stoddard C.I., Feng S., Campbell M.G. et al. A nucleosome bridging mechanism for activation of a maintenance DNA methyltransferase // Mol. Cell. 2019. V. 73. P. 73–83.

Sultan S.E. Developmental plasticity: re-conceiving the genotype // Interface Focus. 2017. V. 7. № 5. P. 20170009.

Surguchov. A., Emamzadeh F.N., Surguchev A.A. Amyloidosis and longevity: A lesson from plants //Biology. 2019. V. 8. № 2. P. 43.

Szymkowiak E.J., Sussex I.M. What chimeras can tell us about plant development // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 351–376.

Tamiru M., Hardcastle T.J., Lewsey M.G. Regulation of genome-wide DNA methylation by mobile small RNAs // New Phytol. 2018. V. 217. P. 540–546.

Torres I.O., Fujimori D.G. Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation // Curr. Opin. Struct. Biol. 2015. V. 35. P. 68–75.

Tricker P.J., Gibbings J.G., Rodríguez et al. Low relative humidity triggers RNA-directed *de novo* DNA methylation and supression of genes controlling stomatal development // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 3799–3813.

Tricker P.J., López C.M., Gibbings G. et al. Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 6674–6689.

Ueda M., Seki M. Histone modifications form epigenetic regulatory networks to regulate abiotic stress response // Plant Physiol. 2020. V. 182. № 1. P. 15–26.

Ullah F., Hamilton M., Reddy A.S.N., Ben-Hur A. Exploring the relationship between intron retention and chromatin accessibility in plants // BMC Genomics. 2018. V. 19. P. 21.

Vanden Broeck A., Cox K., Brys R. et al. Variability in DNA methylation and generational plasticity in the Lombardy poplar, a single genotype worldwide distributed since the eighteenth century // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1635.

van Veen H., Sasidharan R. Shape shifting by amphibious plants in dynamic hydrological niches // New Phytol. 2021. V. 229. P. 79–84.

Velanis C.N., Perera P., Thomson B. et al. The domesticated transposase ALP2 mediates formation of a novel Polycomb protein complex by direct interaction with MSI1, a core subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) // PLoS Genet. 2020. V. 16. № 5. P. e1008681.

Verhoeven K.J.F., Preite V. Epigenetic variation in asexually reproducing organisms // Evolution. 2014. V. 68. P. 644–655.

Waddington C.H. The basic ideas of biology // Towards a Theoretical Biology / Ed. Waddington C.H. V. 1. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1968. P. 1–32. Перевод Уоддингтон К.Х. Основные биологические концепции. В кн.: На пути к теоретической биологии. М.: Мир, 1970. С. 11–46.

Wang M., Zhang K., Ngo V. et al. Identification of DNA motifs that regulate DNA methylation // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. № 13. P. 6753–6768.

Wei G., Liu K., Shen T. et al. Position-specific intron retention is mediated by the histone methyltransferase SDG725 // BMC Biol. 2018. V. 16. P. 44.

Weigel D., Colot V. Epialleles in plant evolution // Genome Biol. 2012. V. 13. № 10. P. 249.

Wienholz B.L., Kareta M.S., Moarefi A.H. et al. DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo // PLoS Genet. 2010. V. 6. P. e1001106.

Whipple C. Defining the plant germ line-nature or nurture? // Science. 2012. V. 337. Iss. 6092. P. 301–302.

Williams B.P., Gehring M. Principles of epigenetic homeostasis shared between flowering plants and mammals // Trends Genet. 2020. V. 36. № 10. P. 751–763.

Wu H.W., Deng S., Xu H. et al. A noncoding RNA transcribed from the AGAMOUS (AG) second intron binds to CURLY LEAF and represses AG expression in leaves // New Phytol. 2018. V. 219. P. 1480–1491.

Wu M.F., Yamaguchi N., Xiao J. et al. Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate // Elife. 2015. V. 4. P. e09269.

Wu Z., Fang X., Zhu D., Dean C. Autonomous pathway: *FLOWERING LOCUS C* repression through an antisense-mediated chromatin-silencing mechanism // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 27–37.

Xiao J., Wagner D. Polycomb repression in the regulation of growth and development in Arabidopsis // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V.23. P. 15–24.

Xiao X., Zhang J., Li T. et al. A group of SUVH methyl-DNA binding proteins regulate expression of the DNA demethylase ROS1 in *Arabidopsis* // Journal of Integrative Plant Biology. 2019. V. 61. № 2. P. 110–119.

Xu F., Feng X., Chen X. et al. Cytoplasmic Argonaute protein promotes the inheritance of RNAi // Cell Rep. 2018. V. 23. P. 2482–2494.

Xu L. De novo root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition // Curr. Opin. Plant Biol. 2018. V. 41. P. 39–45.

Xu Y., Zhang L., Wu G. Epigenetic regulation of juvenile-to-adult transition in plants // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1048.

Yan B., Lv Y., Zhao C., Wang X. Knowing when to silence: roles of polycomb-group proteins in SAM maintenance, root development, and developmental phase transition // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 16. P. 5871.

Yu Z., Zhang G., Teixeira da Silva J.A. et al. DNA methyltransferase and demethylase gene families in *Dendrobium officinale* reveal their potential functions in polysaccharide accumulation // BMC Plant Biology. 2021. V. 21. P. 21.

Zhang H., Lang Z., Zhu J.K. Dynamics and function of DNA methylation in plants // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2018. V. 19. P. 489–506.

Zhang H.M., Lang Z.B., Zhu J.K. Dynamics and function of DNA methylation in plants // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 489–506.

Zhang L., Cheng Z., Qin R. et al. Identification and characterization of an epi-allele of *FIE1* reveals a regulatory linkage between two epigenetic marks in rice // Plant Cell. 2012. V. 24. № 11. P. 4407–4421.

Zhang X., Bernatavichute Y.V., Cokus S. et al. Genomewide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana* // Genome Biol. 2009. V. 10. № 6. P. R62.

Zhang X., Clarenz O., Cokus S. et al. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis* // PLoS Biol. 2007. V. 5. P. e129.

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A. et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* // Cell. 2006. V. 126. № 6. P. 1189–1201.

Zhang Y.Y., Fischer M., Colot V., Bossdorf O. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity // New Phytol. 2013. V. 197. P. 314–322.

Zhang Y.Z., Lin J., Ren Z. et al. Genome-wide distribution and functions of the AAE complex in epigenetic regulation in *Arabidopsis* // J. Integr. Plant Biol. 2021. V. 63. № 4. P. 707–722.

Zheng X., Chen L., Xia H. et al. Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 39843.

Zhu H., Wang G., Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation // Nature Rev. Genet. 2016. V. 17. P. 551–565.

Paradoxes of Plant Epigenetics

T. A. Ezhova*

Department of Genetics, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie gori 1, building 12, Moscow, 119234 Russia

**e-mail: ezhova2001@mail.ru*

Plants have a unique ability to adapt ontogenesis to changing environmental conditions and stress factors. This ability is based on the existence of two features of epigenetic regulation in plants, which at first glance seem to be mutually exclusive. On the one hand, plants are capable of partial epigenetic genome reprogramming, which can lead to the adaptation of physiology and metabolism to changed environmental conditions, as well as to changes in ontogenetic programs. On the other hand, plants can exhibit remarkable stability of epigenetic modifications, which allows epigenetic modifications to be transmitted to vegetative and sexual generations. The combination of these inextricably linked epigenetic features not only ensures survival in a sessile lifestyle, but also underlies a surprisingly wide morphological diversity of plants, which can lead to the appearance of morphs within one population and the existence of interpopulation morphological differences. The review discusses the molecular and genetic mechanisms that determine the paradoxical combination of the properties of stability and lability of epigenetic modifications and may underlie the developmental polyvariancy. The existing approaches to studying the role of epigenetic regulation in the manifestation of polyvariant ontogenesis are also considered, their limitations and prospects are discussed.

Keywords: plant epigenetics, developmental polyvariancy, molecular mechanisms of plasticity of ontogenesis

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 419–428

ОБЗОРЫ

УДК 591.3

РАЗВИТИЕ СЕТИ СЕМЕННИКА И ЕЕ РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МУЖСКОЙ ГОНАДЫ

© 2021 г. А. Ю. Кулибин[a], *, Е. А. Малолина[a]

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

**e-mail: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.06.2021 г.
После доработки 30.06.2021 г.
Принята к публикации 05.07.2021 г.

Сеть семенника или *rete testis* – первый отдел выносящей системы, соединяющей извитые семенные канальцы, в которых развиваются половые клетки, с выносящими канальцами и придатком семенника – эпидидимисом, где гаметы дозревают и приобретают мобильность. Морфогенез этой структуры у мышей в эмбриональный и постнатальный периоды развития был детально изучен в нескольких недавних исследованиях. Показано, что часть сети семенника возникает из предшественников соматических клеток гонады еще до момента детерминации пола. Другая часть образуется из эмбриональных клеток Сертоли половых тяжей, прилежащих к мезонефросу. Процесс трансформации клеток Сертоли в клетки *rete testis*, по-видимому, не ограничивается только эмбриональным этапом развития, а продолжается также в постнатальном развитии семенников. Недавно было установлено, что сеть семенника участвует в формировании и поддержании региональной специализации клеток Сертоли концевых участков извитых семенных канальцев – транзиторных зон. Согласно современным представлениям, транзиторные зоны семенных канальцев могут представлять собой нишу для сперматогониальных стволовых клеток, область длительной пролиферации клеток Сертоли в пубертатный и постпубертатный периоды развития семенника, а также служить генератором сперматогенных волн. Исходя из всего этого можно заключить, что сеть семенника не ограничивается лишь транспортом гамет из семенника в эпидидимис, поддержанием внутритестикулярного давления и регуляцией состава выделяемой семенниками жидкости, но также влияет на сам сперматогенный процесс.

Ключевые слова: сеть семенника, *rete testis*, клетка Сертоли, эмбриональное развитие сети семенника, транзиторные зоны извитых семенных канальцев, сперматогенез

DOI: 10.31857/S0475145021060070

ВВЕДЕНИЕ

У большинства животных, за исключением наиболее примитивных форм, процесс развития мужских гамет – сперматогенез, происходит в специализированных органах – семенниках. У млекопитающих их структурной единицей являются извитые семенные канальцы (рис. 1а), в сперматогенном эпителии которых и развиваются половые клетки. Процесс дифференцировки начинается со сперматогониальных стволовых клеток (ССК), расположенных на базальной мембране в окружении соматических клеток Сертоли (КС), выполняющих как нишеобразующую функцию, так и поддерживающих развитие половых клеток на всех этапах сперматогенеза (рис. 1б). ССК, вступая в дифференцировку, вначале претерпевают ряд митотических делений, а затем входят в профазу мейоза, где происходит последний раунд репликации ДНК перед двумя последовательными делениями, завершающимися формированием гаплоидных округлых сперматид. Мейотические половые клетки на стадии прелептотены покидают базальную мембрану, пересекают область плотных контактов между соседними КС и переносятся в адлюминальный компартмент (рис. 1б), где завершают процесс мейоза и вступают в последний этап дифференцировки – спермиогенез. В процессе спермиогенеза округлые сперматиды через ряд морфологических изменений, охватывающих все органеллы клетки, преобразуются в удлиняющиеся сперматиды (рис. 1б). Последние теряют связь со сперматогенным эпителием и попадают в просвет семенного канальца, становясь сперматозоидами. Сперматозоиды далее покидают семенник и с током жидкости, образуемым КС, переносятся из семенных канальцев в первый отдел выносящей системы – сеть семенника или *rete testis* (рис. 1в).

Сеть семенника представляет собой группу связанных друг с другом полостей и каналов, вы-

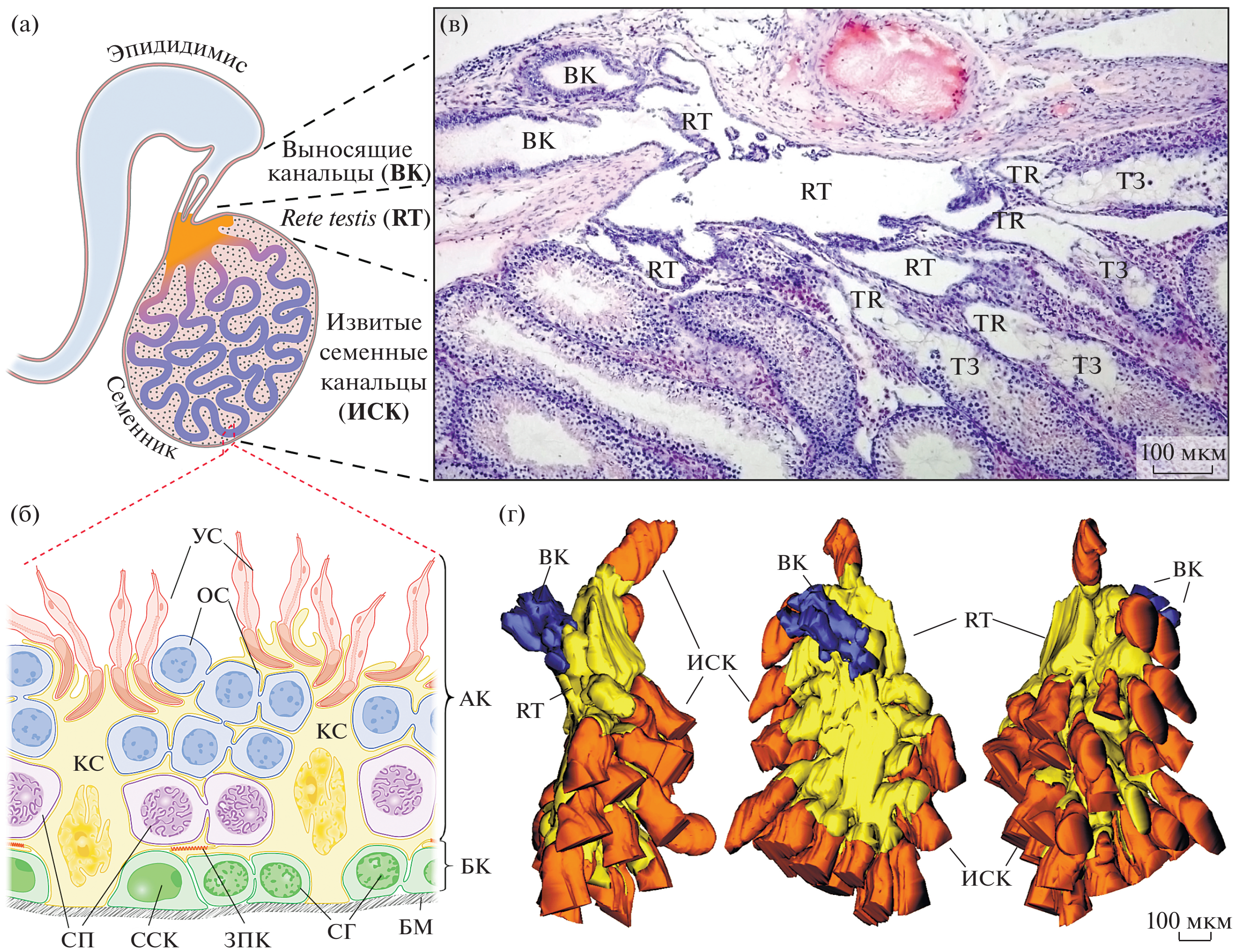


Рис. 1. Строение семенника мыши, сети семенника (*rete testis*) и сегмента сперматогенного эпителия извитого семенного канальца. (а) – схема строения семенника взрослой мыши с выносящими канальцами и эпидидимисом. Извитые семенные канальцы представляют собой дугу, обоими концами соединяющуюся с сетью семенника. Снаружи канальцы окружены интерстициальной тканью. (б) – схема поперечного среза сегмента сперматогенного эпителия. Обозначения: АК – адлюминальный компартмент сперматогенного эпителия, БК – базальный компартмент, БМ – базальная мембрана, ЗПК – зона плотных контактов между соседними клетками Сертоли, КС – клетка Сертоли, ОС – округлые сперматиды, СГ – дифференцирующиеся сперматогонии, СП – сперматоциты, ССК – сперматогониальные стволовые клетки, УС – удлиняющиеся сперматиды. (в) – срез семенника половозрелой мыши в области сети семенника, окраска гематоксилин-эозином. Обозначения: ВК – выносящие канальцы, RT – сеть семенника (*rete testis*), TR – прямые канальцы (*tubuli recti*), ТЗ – транзиторные зоны. (г) – трехмерная реконструкция по серийным срезам сети семенника, начальных участков выносящих канальцев и концевых участков извитых семенных канальцев взрослой мыши, представлена в нескольких проекциях.

стланных однослойным эпителием, по которым сперматозоиды переносятся из гонады через выносящие канальцы в придаток семенника – эпидидимис, где окончательно созревают и приобретают мобильность (рис. 1а, 1в, 1г). В то время как биология ССК, КС, а также весь процесс развития мужских половых клеток достаточно хорошо изучены и освещены во множестве обзоров (Griswold, 1998, 2018; Hess, Renato de Franca, 2008; Kopera et al., 2010; Kubota, Brinster, 2018; de Rooij, 2017), процессы развития сети семенника и понимание ее роли в функционировании сперматогенной системы только начинают приобретать ясность. Так, в недавнем исследовании (Imura-Kishi et al., 2021) была установлена роль сети семенника в поддержании региональной специализации КС концевых отделов (транзиторных зон) извитых семенных канальцев. Есть сведения, что концевые отделы семенных канальцев являются нишей для *Gfra1*$^{+}$ ССК (Aiyama et al., 2015), местом длительной пролиферации КС в пубертальном и постпубертальном семеннике (Figueiredo et al., 2016, 2019; Малолина, Кулибин, 2017), а также местом генерации сперматогенных волн, поддерживающих непрерывность развития мужских половых клеток (Perey et al., 1961). Взятые вместе, результаты этих работ позволяют расширить функции сети семенника от простого транзита гамет из семенника в эпидидимис, поддержания внутритестикулярного давления и регуляции состава, выделяемой семенниками жидкости (Hess, Hermo, 2018), до участия в развитии сперматогенной системы и поддержке сперматогенеза. В настоящем обзоре мы кратко рассмотрим последние данные по развитию сети семенника у мышей, структуру и функции транзиторных зон извитых семенных канальцев и участие *rete testis* в их формировании.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ СЕТИ СЕМЕННИКА У МЫШЕЙ

У мышей развитие гонад начинается около 9.0 сут эмбрионального развития (E9.0), когда *Sf1*$^{+}$ (Steroidogenic factor 1), *Wt1*$^{+}$ (Wilms' tumor protein 1) клетки целомического эпителия, расположенные на вентральной стороне мезонефроса, начинают активно пролиферировать и погружаться в его паренхиму, формируя к E9.5 небольшие утолщения (половые валики), обращенные в целомическую полость. На E10.0 валики начинают заселять половые клетки, приходящие из задней кишки (Nef et al., 2019). В этот момент развития гонады устроены одинаково у обоих полов, а составляющие их *Sf1*$^{+}$ предшественники соматических клеток бипотенциальны и могут дифференцироваться как в клетки яичников, так и семенников.

Выбор пути дальнейшего развития – детерминация пола, запускается сложным каскадом экспрессии генов. Для большинства млекопитающих, в том числе мышей, ключевым фактором, определяющим развитие семенников, является ген Y хромосомы *Sry* (Sex-determining region Y), в отсутствие экспрессии которого гены *Rspo1* (R-spondin 1) и *Wnt4* (Wnt family member 4) направляют развитие бипотенциальных гонад в яичники (Svingen, Koopman, 2013). *Sry* запускает экспрессию гена *Sox9* (SRY-box transcription factor 9) в клетках предшественниках, активируя в них программу развития в КС. Те в ответ начинают высоко экспрессировать гены-маркеры КС *Amh* (Anti-Mullerian hormone) и *Dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1), активно пролиферировать и к E12.5 формируют нерегулярную сеть из половых тяжей с половыми клетками, расположенными в центре (Cool et al., 2012).

Половые тяжи – предшественники извитых семенных канальцев семенника, а мезонефрический проток и канальцы мезонефроса дают начало большей части его выносящей системы, соответственно, эпидидимису и выносящим канальцам. Сеть же семенника закладывается как связующая структура между двумя этими зачатками (рис. 2а). Такое положение сети семенника определяет особенности ее формирования. Согласно полученным недавно данным (Kulibin, Malolina, 2020; Omotehara et al., 2020, подробно рассмотрены в обзоре Major et al., 2021), у мышей эта структура может закладываться как два отдельных зачатка. Один из них начинает формироваться еще на стадии бипотенциальной гонады на E10.5 из небольшой группы *Sf1*$^{+}$ клеток-предшественников, расположенных между канальцами мезонефроса на переднем конце гонады (Omotehara et al., 2020, рис. 2б1). Эти клетки к E12.5 образуют уже сеть канальцев, распространяющуюся от переднего конца гонады до заднего и контактирующую с одной стороны с канальцами мезонефроса, а с другой – с половыми тяжами гонады (рис. 2б2).

Вторая часть сети семенника начинает развиваться после E13.5 из соединенных между собой в единую сеть концевых отделов половых тяжей, обращенных в сторону мезонефроса (рис. 2б3, 2б4), т.е. из эмбриональных КС (Kulibin, Malolina, 2020). В процессе трансформации в клетки *rete testis* КС начинают экспрессировать *Pax8* (Paired box 8) – маркер клеток сети семенника (Ozcan et al., 2011; Malolina, Kulibin, 2019), теряют экспрессию *Amh*, но частично сохраняют экспрессию *Dmrt1* (рис. 2б4). Этот процесс начинается на переднем конце гонады и распространяется к ее заднему концу, завершаясь к E16.5 формированием отдельных *Amh*$^{+}$ половых тяжей, которые соединены между собой *Pax8*$^{+}$ канальцами сети семенника (рис. 2б5). Такое сложное формирование *rete testis* из двух частей, по-видимому, необходимо для правильного соединения между собой в единую сеть всех концов половых тяжей, число которых на E13.5–14.5 колеблется между 10 и 11 (Nel-Themaat et al., 2009), с концами 4-х канальцев мезонефроса выносящей системы.

Можно резюмировать, что обе представленные работы (Kulibin, Malolina, 2020; Omotehara et al., 2020) приводят доказательства в пользу гипотезы о "гонадном" происхождении клеток сети семенника (Combes et al., 2009) в противовес предположению о ее "мезонефрическом" происхождении (Zamboni, Upadhyay, 1982; Wrobel, 2000; Joseph et al., 2009).

При развитии яичников на границе между гонадой и мезонефросом также образуется структура, гомологичная сети семенника – сеть яичника или *rete ovary* (Byskov, Lintern-Moore, 1973). Омотехара и соавторы (Omotehara et al., 2020) показали, что ее формирование в эмбриональном развитии происходит схожим образом, из *Sf1*$^{+}$ клеток, выделившихся на стадии индифферентной гонады. В двух работах (Kulibin, Malolina, 2020; McKey et al., 2021) было показано, что в сети яичника в

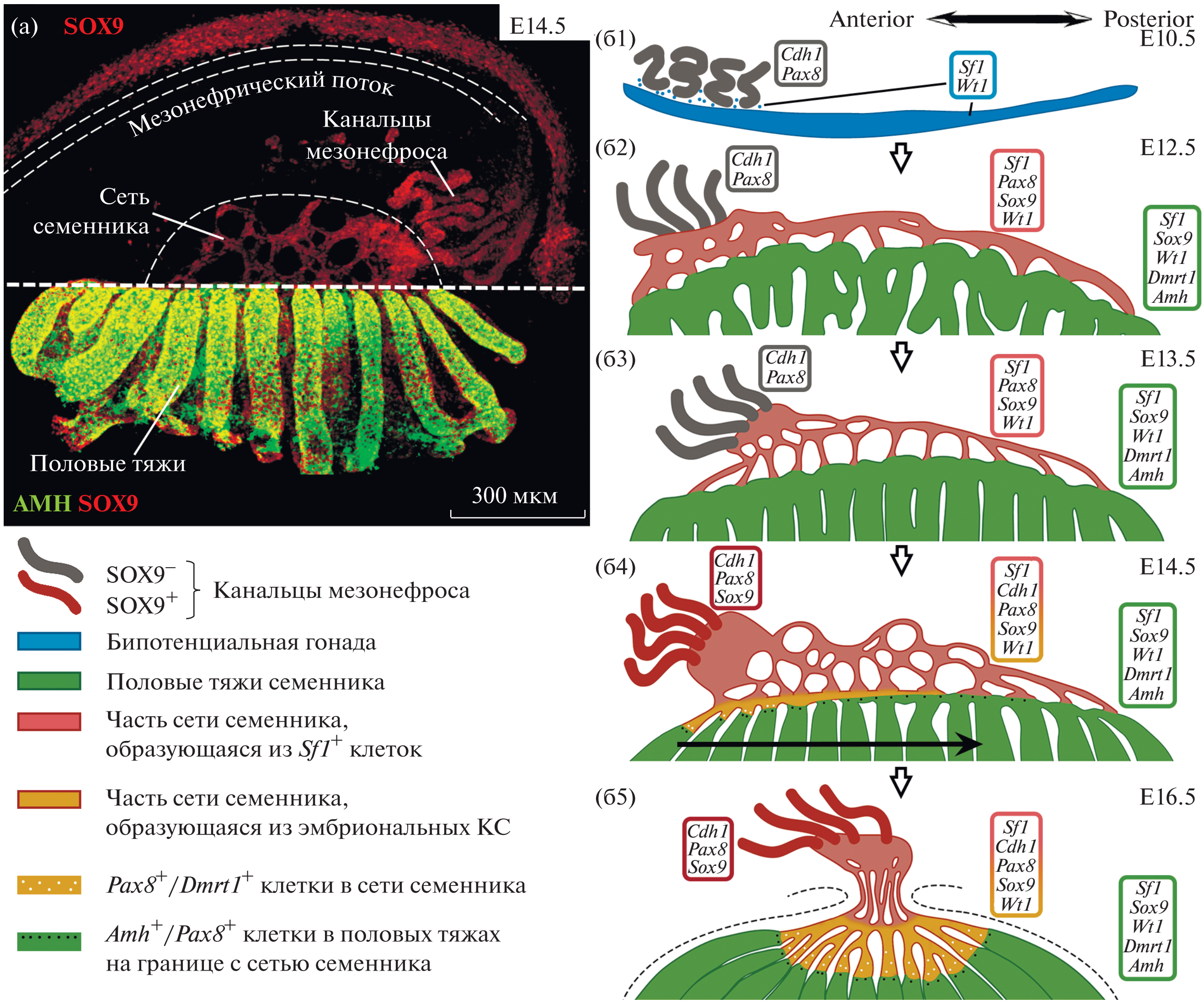


Рис 2. Эмбриональное развитие сети семенника мышей. (а) – репрезентативная фотография гонадо-мезонефрического комплекса мышей на E14.5, окрашенного на Sox9 и AMH. Максимальная проекция с серии оптических срезов, снятых на конфокальном микроскопе (взята из работы (Kulibin, Malolina, 2020) и представлена здесь с небольшими изменениями). (б1–б5) – схема развития сети семенника у мышей. (б1–б2) по данным (Omotehara et al., 2020). (б3–б5) – часть схемы взята из работы (Kulibin, Malolina, 2020) и представлена здесь с небольшими изменениями. Стрелка на (б4) – указывает направление формирования части сети семенника, образующейся из эмбриональных КС. В прямоугольных вставках на схеме указаны гены-маркеры канальцев мезонефроса, сети семенника и половых тяжей на различные сроки эмбрионального развития.

непосредственной близости от гонады есть клетки, ко-экспрессирующие *Pax8* и маркер фолликулярных клеток *FoxL2* (Forkhead box L2). Присутствие таких клеток позволяет предположить, что фолликулярные клетки, подобно эмбриональным КС, принимают участие в формировании сети яичника. Не исключен также и обратный процесс трансформации клеток *rete ovary* в клетки яичника. Так, есть доказательства, что клетки сети яичника могут становиться клетками теки (Smith et al., 2014; Liu et al., 2015). Окончательный ответ на этот вопрос может быть получен только после проведения lineage tracing исследования.

Мало что известно о механизмах регуляции развития сети, но можно предположить, что транскрипционный фактор Pax8, который вместе с Pax2 принимает участие в развитии мезонефроса (Sharma et al., 2015), также играет важную роль в формировании сети у обоих полов. Так, согласно данным Омотехары и соавторов (Omotehara et al., 2020), часть сети семенника и яичника возникает из $Sf1^{+}$ клеток, которые начинают экспрессировать *Pax8* между E11.5–12.5 (Kulibin, Malolina, 2020), во время формирования ими канальцев сети. Кроме этого, присутствие клеток с промежуточным фенотипом *Pax8*$^+$/*Amh*$^+$ (рис. 2б4, 2б5) на границе между новообразованной сетью семенника и половыми тяжами (Kulibin, Malolina, 2020) указывает на участие Pax8 в процессе трансформации КС в клетки *rete testis*.

Также вероятно, что морфогенетические факторы, продуцируемые клетками канальцев мезонефроса, могут поддерживать процессы формирования сети семенника и ее присоединение к выносящей системе. Как отмечают Омотехара с соавторами (Omotehara et al., 2020), присоединение канальцев мезонефроса к сети семенника может регулироваться *Notch* сигнальным путем. Ретиноевая кислота (РК), вырабатываемая мезонефросом, распространяется от переднего конца гонады к заднему и также может быть вовлечена в морфогенез сети семенника. Так, искусственное увеличение концентрации РК в эмбриональных семенниках приводит к возрастанию экспрессии *Nr0b1* (nuclear receptor subfamily 0 group B member 1), подавляющего экспрессию генов-маркеров КС, в том числе и *Amh* (Bowles et al., 2018). Известно, что после E12.5 *Nr0b1* высоко экспрессируется в клетках сети семенника (Swain et al., 1996; Ikeda et al., 2001). Можно предположить, что после E13.5 концентрация РК на границе между мезонефросом и семенником достаточно высока, чтобы увеличить экспрессию *Nr0b1* в КС половых тяжей и подавить в них экспрессию *Amh*, что совместно с действием Pax8 приведет к трансформации КС в клетки сети семенника, но для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

С другой стороны, клетки формирующейся сети семенника, могут, совместно с клетками гонады, вырабатывать факторы, поддерживающие выживание и пролиферацию клеток канальцев мезонефроса. Одним из таких факторов, как отмечают де Мело Сантос и Хинтон (de Mello Santos, Hinton, 2019), мог бы быть эпидермальный фактор роста (EGF), предотвращающий клеточную гибель в развивающейся почке (Carev et al., 2008).

РАЗВИТИЕ СЕТИ СЕМЕННИКА МЫШЕЙ В ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Формирование сети семенника, начавшиеся в эмбриональный период развития, продолжается и в постнатальный период. В это время клетки сети семенника активно пролиферируют и формируют полость, выстланную однослойным эпителием, высота которого изменяется в разных участках от плоского до кубического (Major et al., 2021; Малолина, Кулибин, 2017). Снаружи сеть семенника окружена слоем перитубулярно-мышечных клеток, а также интерстициальной тканью, пронизанной сетью кровеносных и лимфатических капилляров (см. рис. 3, Rebourcet et al., 2014; Figueiredo et al., 2016). Пролиферация клеток сети семенника у мышей *in vivo* в постнатальном периоде развития заканчивается примерно в то же время, когда и пролиферация КС в извитых семенных канальцах, то есть после 18 сут (Малолина, Кулибин, 2017). Тем не менее, клетки сети семенника, полученные от взрослых мышей, в отличие от КС извитых семенных канальцев сохраняют способность к активной пролиферации и формированию колоний в клеточной культуре (Малолина, Кулибин, 2018; Malolina, Kulibin, 2019).

В недавнем исследовании (Malolina, Kulibin, 2019) были выявлены гены-маркеры клеток сети семенника, которыми являются уже упомянутый *Pax8*, а также *Krt8* (Keratin 8) и *Cdh1* (Cadherin 1, Aiyama et al., 2015). Интересно, что на 6 сутки постнатального развития значительная часть клеток сети семенника также экспрессирует маркер КС ген *Dmrt1*, экспрессия которого затем снижается и у взрослых животных остается лишь в единичных клетках сети. Кроме этого, в сети семенника на 6 сутки после рождения в областях присоединения к извитым семенным канальцам присутствует много *Amh*$^+$/*Dmrt1*$^+$ КС, а также клеток, экспрессирующих одновременно маркеры КС и клеток сети семенника: *Amh*$^+$/*Sox9*$^+$/*Cdh1*$^+$, *Amh*$^+$/*Sox9*$^+$/*Pax8*$^+$ и *Amh*$^+$/*Dmrt1*$^+$/*Cdh1*$^+$ клеток. Присутствие таких клеток в сети семенника в этот период может объяснить большое количество *Dmrt1*$^+$ клеток в ней, а также позволяет предположить, что пополнение клеток сети за счет КС может продолжаться и в постнатальный период развития этой структуры. Снижение экспрессии *Dmrt1* в клетках сети у взрослых животных по сравнению с 6 сут постнатального развития можно рассматривать как расхождение в путях дифференцировки между КС извитых семенных канальцев и клетками сети семенника. Это предположение подтверждается данными ПЦР анализа, показывающего, что уровень экспрессии генов-маркеров КС в клетках сети семенника у 6-ти суточных животных больше соответствует таковому в КС того же возраста, чем в клетках сети и КС, полученных от взрослых животных (Malolina, Kulibin, 2019).

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ КОНЦЕВЫХ ОТДЕЛОВ ИЗВИТЫХ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ

Сеть семенника образует специальные выросты – прямые канальцы или *tubuli recti* (рис. 1в), посредством которых она соединяется с концевыми отделами извитых семенных канальцев, т.н. транзиторными зонами (ТЗ) (Roosen-Runge, Holstein, 1978; Hess, Hermo, 2018). На рис. 3 представлена схема и гистологический срез концевого отдела семенного канальца мыши. Как видно из рисунка, в ТЗ происходит постепенное уменьшение диаметра канальца за счет исчезновения из него

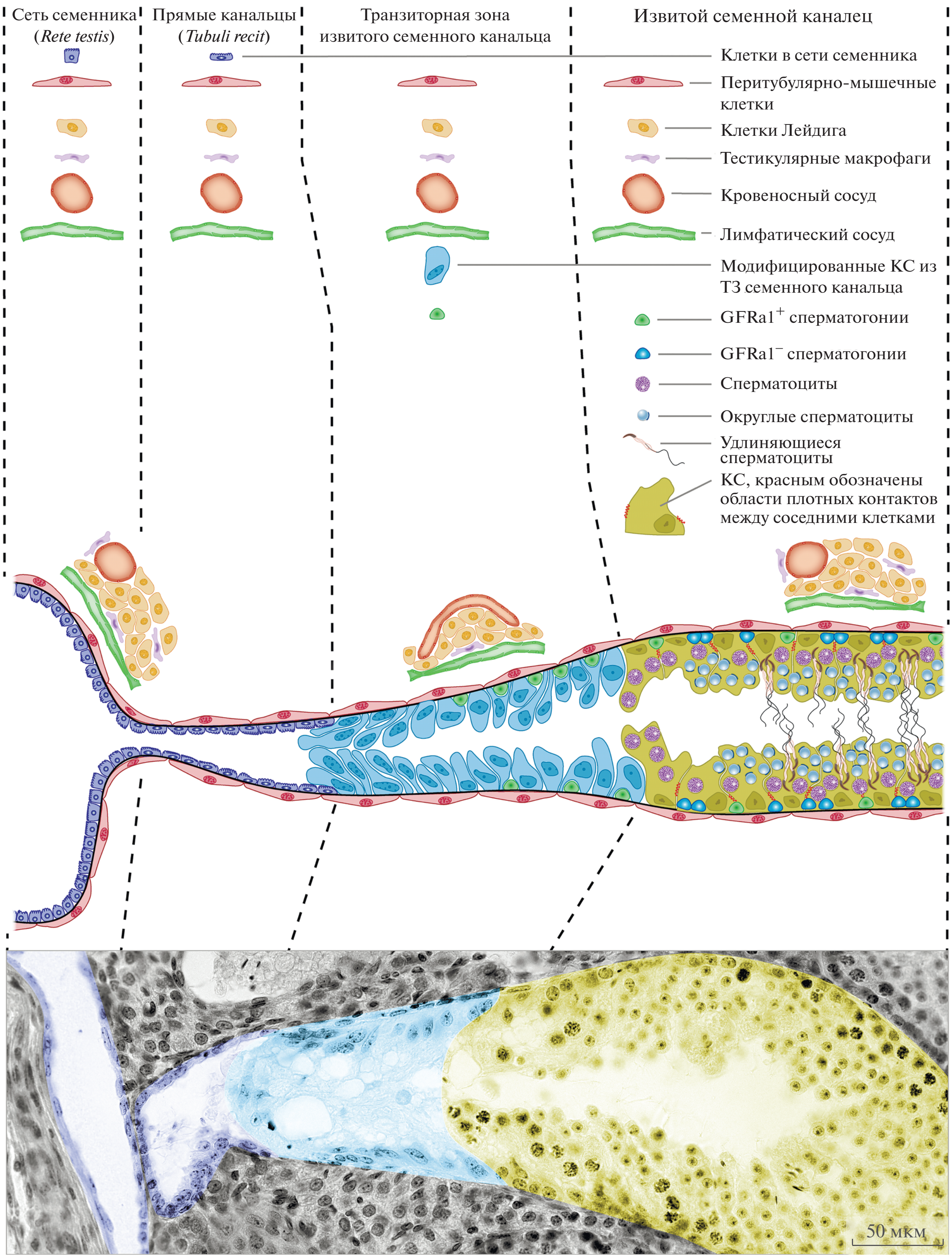


Рис. 3. Схема строения транзиторной зоны извитого семенного канальца и сети семенника взрослых мышей. В нижней части рисунка представлена репрезентативная фотография среза концевого отдела извитого семенного канальца половозрелой мыши, окраска гематоксилин-эозином. На фотографии цветной кодировкой обозначены различные участки сети семенника и семенного канальца, представленные на схеме выше.

половых клеток. В результате, в концевой части ТЗ находятся только немногочисленные сперматогониальные клетки и КС, имеющие, по данным электронно-микроскопических исследований (Perey et al., 1961; Dym, 1974; Nykänen, 1979; Wrobel et al., 1986), видоизмененную морфологию. Эти видоизмененные КС, лишенные связи с половыми клетками, образуют цитоплазматические выросты, занимающие почти весь просвет и формирующие в конце своеобразный клапан (Hermo, Dworkin, 1988), который позволяет только односторонний ток жидкости и сперматозоидов из извитых семенных канальцев в сеть семенника и, затем, в выносящие канальцы (рис. 3).

Согласно Никанену (Nykänen, 1979), ядра ТЗ КС имеют обычную для КС многолопастную форму, но с бóльшим числом периферических гетерохроматиновых глыбок (рис. 3), что делает их похожими на ядра недифференцированных КС неполовозрелых животных. Действительно, КС из ТЗ не полностью дифференцированы. Так, по данным Фигуеиредо и соавторов (Figueiredo et al., 2016), у половозрелых крыс только часть из них экспрессирует такие важные маркеры дифференцировки КС как транскрипционный фактор *Gata 4* (GATA binding protein 4) и андрогеновый рецептор (*Ar*, androgen receptor). В ТЗ КС снижена экспрессия транскрипционного фактора *Dmrt1* (Kulibin, Malolina, 2016; Малолина, Кулибин, 2017; Malolina, Kulibin, 2019), необходимого для правильной дифференцировки КС в процессе полового созревания и поддержания развития половых клеток (Raymond et al., 2000; Kim et al., 2007; Matson et al., 2011; Minkina et al., 2014). В то же время, по данным Аиямы и соавторов (Aiyama et al., 2015), в ТЗ КС повышен уровень экспрессии регулятора пролиферации ССК фактора роста GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor, Meng et al., 2000). Наконец, Иммура-Киши и соавторы (Imura-Kishi et al., 2021) показали, что для ТЗ КС характерен высокий уровень экспрессии фермента, разрушающего РК – цитохрома *Cyp26a1* (cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1). РК исключительно важна для поддержания пролиферации и дифференцировки сперматогониальных клеток, равно как и их вступления в мейоз (Gewiss et al., 2020), высокая экспрессия фермента, разрушающего ее, объясняет отсутствие в ТЗ дифференцирующихся половых клеток. Вместе с тем, повышенная экспрессия GDNF способствует поддержанию популяции *Gfra1*$^{+}$ ССК и формированию ниши (Aiyama et al., 2015). Так как ниши для ССК встречаются по всей длине извитых семенных канальцев (Kubota, Brinster, 2018; de Rooij, 2017) и поддерживают баланс между пролиферацией и дифференцировкой ССК в норме, то "концевые" ниши в ТЗ могут играть роль резерва.

Еще одна интересная особенность ТЗ КС у грызунов была отмечена в нескольких недавних исследованиях, проведенных на сирийских хомяках, крысах и мышах (Aiyama et al., 2015; Figueiredo et al., 2016, 2019; Малолина, Кулибин, 2017). Это продленная, по сравнению с КС из извитых семенных канальцев, пролиферация ТЗ КС в постнатальном развитии семенников. Как отмечают Фигуеиредо и соавторы (Figueiredo et al., 2016, 2019), это явление может широко встречаться среди млекопитающих других видов, но ранее не было замечено исследователями из-за того, что они не изучали пролиферацию КС в ТЗ. Как показали авторы в одной из своих последних работ (Figueiredo et al., 2019), транзиторный гипотиреоз у крыс, вызванный введением ингибитора синтеза гормона Т3 – PTU (goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil) после 21-х суток постнатального развития, когда КС в извитых семенных канальцах уже дифференцированы и не способны к пролиферации, приводит к увеличению массы семенников, числа КС и выработки спермы у 160-суточных крыс по сравнению с интактным контролем, за счет пролиферации КС в ТЗ. Результаты этой работы показывают, что сперматогенная система, теоретически, с помощью такой дополнительной пролиферации КС в ТЗ может компенсировать их недостаток в извитых семенных канальцах в случае нарушений процессов развития и, таким образом, обеспечивать достаточную для фертильности выработку зрелых гамет.

Наконец, как уже давно известно, сперматогенные волны берут начало от ТЗ семенных канальцев. Сперматогенная волна, впервые описанная Переем и соавторами (Perey et al., 1961), представляет собой серию смежных сегментов семенного канальца, содержащих все возможные сочетания дифференцирующихся половых клеток – стадии цикла сперматогенного эпителия (у мышей их 12, Oakberg, 1956; у крыс 14, Leblond, Clermont, 1952). Если проследить сперматогенную волну от ТЗ, то, чем дальше мы будем уходить от сети семенника, тем более ранние стадии цикла будем встречать. Сперматогенные волны определяют пространственно-временную организацию сперматогенеза, без которой совместное развитие множества генераций половых клеток по всему семеннику будет невозможно. Механизм формирования волн неизвестен, но ТЗ, вероятно, участвуют в этом процессе.

ФУНКЦИИ СЕТИ СЕМЕННИКА ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ

Долгое время было принято считать, что основные функции сети семенника – это транзит гамет из извитых семенных канальцев в выносящие канальцы, а также регуляция белкового и солевого состава семенной жидкости (подробно рассмотрено в обзоре Hess, Hermo, 2018). Кроме этого, в случае возникновения непроходимости различных отделов половых протоков или нарушения абсорбции жидкости в выносящих канальцах, сеть семенника выполняет защитную функцию и регулирует внутритестикулярное давление в семеннике, значительно увеличиваясь в объеме (Lupien et al., 2006; Nanjappa et al., 2016; Hess, Hermo, 2018; Major et al., 2021; Cao et al., 2021).

В недавнем исследовании Иммура-Киши и соавторы (Imura-Kishi et al., 2021) показали, что сеть семенника может участвовать в региональной специализации КС в ТЗ. Исследователи провели трансплантацию меченых КС, полученных из извитых семенных канальцев мышат (C57BL/6-R26-H2B-mCherry), в семенники мышей-реципиентов (C57BL/6-Tg AMH-Treck, Shinomura et al., 2014), чьи КС были предварительно уничтожены введением дифтерийного токсина. Через 45 сут после трансплантации донорские КС формировали новые ТЗ в концевых участках извитых семенных канальцев реципиента, окрашивались на маркеры этой зоны p-AKT (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha, Imura-Kishi et al., 2021) и ace-Tub (ацетилированная форма тубулина, Aiyama et al., 2015) и высоко экспрессировали GDNF, как это происходит в норме.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что специализация ТЗ КС является регион-специфической и определяется факторами, исходящими от сети семенника. Такими факторами могут быть факторы роста фибробластов (FGF fibroblast growth factor). Методом РНК-секвинирования Иммура-Киши и соавторы (Imura-Kishi et al., 2021) показали, что клетки сети семенника высоко экспрессируют FGF9, а на ТЗ КС присутствуют рецепторы к этому фактору роста. Было установлено, что FGF сигналы от сети семенника вызывают в ТЗ КС конститутивную активацию серин/треониновой протеинкиназы (AKT), ключевого фермента фосфоинозитид-3-киназного сигнального пути (PI3K/AKT). В отличие от ТЗ КС, в КС извитых семенных канальцев активность AKT циклически изменяется, достигая максимума на II–VI стадиях цикла сперматогенного эпителия и минимума на IX–XII. Таким образом, фосфорилированный (p-AKT) является молекулярным маркером ТЗ региона, также как и фосфорилированый активатор транскрипции 3 (p-STAT3, Nagasawa et al., 2018), о котором было сообщено ранее.

Авторы установили, что p-AKT впервые появляется в концевых отделах извитых семенных канальцев мышей на 7 сут постнатального развития, свидетельствуя о начале формирования ТЗ региона. Так как PI3K/AKT сигнальный путь активен в большинстве типов клеток и одними из его основных функций являются блокирование апоптоза и стимулирование пролиферации (Chen et al., 2001), можно предположить, что конститутивная активность AKT в ТЗ регионе ответственна за длительную пролиферативную активность КС в концевых участках канальцев, о которой написано выше. Так это или нет еще предстоит установить, но полученные в этой работе результаты дают понять, что сеть семенника это не просто часть выносящей системы, но и важный структурный элемент, участвующий в развитии сперматогенной системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН 2021 года № ГЗ 0088-2021-0009.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку 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.

Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Пролиферативная активность клеток Сертоли извитых семенных канальцев мыши // Цитология. 2018. Т. 60. № 4. С. 308–315.

Aiyama Y., Tsunekawa N., Kishi K., Kawasumi M. et al. A niche for GFRα1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes // Stem Cells (Dayton, Ohio). 2015. V. 33. № 9. P. 2811–2824.

Bowles J., Feng C.W., Ineson J. et al. Retinoic acid antagonizes testis development in mice // Cell Rep. 2018. V. 24. № 5. P. 1330–1341.

Byskov A.G., Lintern-Moore S. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii // J. Anat. 1973. V. 116. P. 207–217.

Cao Y., Liu L., Lin J., Sun P. et al. Dysregulation of Notch-FGF signaling axis in germ cells results in cystic dilation of the rete testis in mice // J. Cell Commun. Signal. 2021. Epub ahead of print.

Carev D., Saraga M., Saraga-Babic M. Expression of intermediate filaments, EGF and TGF-alpha in early human kidney development // J. Mol. Histol. 2008. V. 39. № 2. P. 227–235.

Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L. et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene // Genes Dev. 2001. V. 15. № 17. P. 2203–2208.

Combes A.N., Lesieur E., Harley V.R., Sinclair A.H. et al. Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development // Dev. Dyn. 2009. V. 238. P. 1033–1041.

Cool J., DeFalco T., Capel B. Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex de novo tubulogenesis // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2012. V. 1. № 6. P. 847–859.

Dym M. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti // Am. J. Anat. 1974. V. 140. № 1. P. 1–25.

Figueiredo A.F.A., França L.R., Hess R.A., Costa G.M.J. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats // Cell Cycle. 2016. V. 15. P. 2486–2496.

Figueiredo A.F.A., Wnuk N.T., Tavares A.O., Miranda J.R. et al. Prepubertal PTU treatment in rat increases Sertoli cell number and sperm production // Reprod. 2019. V. 158. № 2. P. 199–209.

Gewiss R., Topping T., Griswold M.D. Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis // Androl. 2020. V. 8. № 4. P. 892–897.

Griswold M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis// Semin. Cell Dev. Biol. 1998. V. 9. № 4. P. 411–416.

Griswold M.D. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells // Biol. Reprod. 2018. V. 99. № 1. P. 87–100.

Hermo L., Dworkin J. Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane // Am. J. Anat. 1988. V. 181. № 2. P. 111–131.

Hess R.A., Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. V. 636. P. 1–15.

Hess R.A., Hermo L. Rete testis: Structure, cell biology and site for stem cell transplantation // Encyclopedia of Reproduction. 2nd ed. Oxford: Academic Press, 2018. P. 263–269.

Ikeda Y., Takeda Y., Shikayama T., Mukai T. et al. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions // Dev. Dyn. 2001. V. 220. № 4. P. 363–376.

Imura-Kishi K., Uchida A., Tsunekawa N., Suzuki H. et al. Low retinoic acid levels mediate regionalization of the Sertoli valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. P. 1110–1124.

Joseph A., Yao H., Hinton B.T. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns // Dev. Biol. 2009. V. 325. № 1. P. 6–14.

Kim S.L., Bardwell V.J., Zarkower D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation// Dev. Biol. 2007. V. 307. № 2. P. 314–327.

Kopera I.A., Bilinska B., Cheng C.Y., Mruk D.D. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2010. V. 27. № 365. P. 1593–1605.

Kubota H., Brinster R.L. Spermatogonial stem cells // Biol. Reprod. 2018. V. 99. № 1. P. 52–74.

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.

Kulibin A.Y., Malolina E.A. Formation of the rete testis during mouse embryonic development // Dev. Dyn. 2020. V. 249. № 12. P. 1486–1499.

Leblond C.P., 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.

Liu C., Peng J., Matzuk M.M., Yao H.H. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 6934.

Lupien M., Dievart A., Morales C.R., Hermo L. et al. Expression of constitutively active Notch1 in male genital tracts results in ectopic growth and blockage of efferent ducts, epididymal hyperplasia and sterility // Dev. Biol. 2006. V. 300. № 2. P. 497–511.

Major A.T., Estermann M.A., Smith C.A. Anatomy, endocrine regulation, and embryonic development of the rete testis // Endocrinol. 2021. V. 162. № 6. P. bqab046.

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.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D. et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis // Nature. 2011. V. 476. P. 101–104.

McKey J., Anbarci D.N., Bunce C., Capel B. Integration of mouse ovary morphogenesis with developmental dynamics of the oviduct, ovarian ligaments, and rete ovarii // bioRxiv 2021. 05.21.445181. Preprint.

Meng X., Lindahl M., Hyvonen M.E. et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF // Science. 2000. V. 287. P. 1489–1493.

Minkina A., Matson C.K., Lindeman R.E. et al. DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation // Dev. Cell. 2014. V. 29. № 5. P. 511–520.

Nagasawa K., Imura-Kishi K., Uchida A. et al. Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in the seminiferous epithelia of mouse testes // Mol. Reprod. Dev. 2018. V. 85. P. 262–270.

Nanjappa M.K., Hess R.A., Medrano T.I., Locker S.H. et al. Membrane-localized estrogen receptor 1 is required for normal male reproductive development and function in mice // Endocrinol. 2016. V. 157. № 7. P. 2909–2919.

Nef S., Stévant I., Greenfield A. Characterizing the bipotential mammalian gonad // Curr. Top. Dev. Biol. 2019. V. 134. P. 167–194.

Nel-Themaat L., Vadakkan T.J., Wang Y., Dickinson M.E. et al. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice // Dev. Dyn. 2009. V. 238. № 5. P. 1100–1110.

Nykänen M. Fine structure of the transitional zone of the rat seminiferous tubule // Cell Tissue Res. 1979. V. 198. № 3. P. 441–454.

Oakberg E.F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal // Am. J. Anat. 1956. V. 99. № 3. P. 391–413.

Omotehara T., Wu X., Kuramasu M., Itoh M. Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex-independent manner // Dev. Dyn. 2020. V. 249. № 6. P. 754–764.

Ozcan A., Shen S.S., Hamilton C., Anjana K. et al. PAX8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study // Mod. Pathol. 2011. V. 24. № 6. P. 751–764.

Perey B., Clermont Y., Leblond C.P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat // Am. J. Anat. 1961. V. 108. P. 47–78.

Raymond C.S., Murphy M.W., O'Sullivan M.G. et al. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation // Genes Dev. 2000. V. 14. № 20. P. 2587–2595.

Rebourcet D., O'Shaughnessy P.J., Pitetti J.L., Monteiro A. et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis // Dev. 2014. V. 141. № 10. P. 2139–2149.

de Rooij D.G. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells // Dev. 2017. V. 144. № 17. P. 3022–3030.

Roosen-Runge E.C., Holstein A.F. The human rete testis // Cell Tissue Res. 1978. V. 189. № 3. P. 409–433.

de Mello Santos T., Hinton B.T. We, the developing rete testis, efferent ducts, and Wolffian duct, all hereby agree that we need to connect // Andrology. 2019. V. 7. № 5. P. 581–587.

Sharma R., Sanchez-Ferras O., Bouchard M. Pax genes in renal development, disease and regeneration // Semin. Cell Dev. Biol. 2015. V. 44. P. 97–106.

Shinomura M., Kishi K., Tomita A., Kawasumi M. et al. A novel Amh-Treck transgenic mouse line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads // Reprod. 2014. V. 148. P. 1–9.

Smith P., Wilhelm D., Rodgers R.J. Development of mammalian ovary // J. Endocrinol. 2014. V. 221. № 3. P. R145–R161.

Swain A., Zanaria E., Hacker A., Lovell-Badge R. et al. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function // Nat. Genet. 1996. V. 12. № 4. P. 404–409.

Svingen T., Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations // Genes Dev. 2013. V. 27. № 22. P. 2409–2426.

Wrobel K.H. Morphogenesis of the bovine rete testis: the intratesticular rete and its connection to the seminiferous tubules // Anat. Embryol. (Berl.) 2000. V. 202. P. 475–490.

Wrobel K.H., Schilling E., Zwack M. Postnatal development of the connexin between tubulus seminiferous and tubulus rectus in the bovine testis // Cell Tissue Res. 1986. V. 246. № 2. P. 387–400.

Zamboni L., Upadhyay S. The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis // Am. J. Anat. 1982. V. 165. № 3. P. 339–356.

The Rete Testis: Development and Role in Testis Function

A. Yu. Kulibin[1], * and E. A. Malolina[1]

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

**e-mail: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com*

The *rete testis* is a structure connecting seminiferous tubules where germ cells develop with efferent ducts and the epididymis where male gametes become mature and acquire motility. Several recent studies have investigated in detail the morphogenesis of this structure during embryonal and postnatal development in mice. It was shown that one part of the rete testis emerges from the precursors of gonadal somatic cells before sex determination. The other part forms from embryonal Sertoli cells of testis cords adjacent to the mesonephros. The transformation of Sertoli cells into *rete testis* cells seems not to be limited to embryonic stage and also continues during postnatal testis development. It was recently shown that the rete testis participates in the formation and maintenance of specialized Sertoli cells in terminal segments of seminiferous tubules, transitional zones. The present understanding is that transitional zones could be the niche for spermatogonial stem cells, the site of Sertoli cell proliferation during pubertal and postpubertal development and also the generator of spermatogenic waves. To sum up, the rete testis not only transports gametes from the testis to the epididymis, maintains pressure within seminiferous tubules and regulates the composition of testicular fluid but also impacts on the spermatogenic process itself.

Keywords: rete testis, Sertoli cell, embryonal development of the rete testis, transitional zone of seminiferous tubules, spermatogenesis

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 429–440

ОБЗОРЫ

УДК 591.3

ДИНАМИКА ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ И В КУЛЬТУРЕ

© 2021 г. М. Н. Гордеев[a], Е. И. Бахмет[a], А. Н. Томилин[a, *]

[a]ФГБУН Институт цитологии РАН, Тихорецкий проспект 4, Санкт-Петербург, 194064 Россия

**e-mail: a.tomilin@incras.ru*

Поступила в редакцию 17.05.2021 г.
После доработки 08.06.2021 г.
Принята к публикации 15.06.2021 г.

Для раннего эмбрионального развития мыши и человека характерно наличие недифференцированных плюрипотентных клеток, которые дают начало всем тканям развивающегося эмбриона. Такие клетки еще 40 лет назад удалось выделить и культивировать в стабильном плюрипотентном состоянии. С тех пор накопилось множество данных о механизмах, лежащих в основе функционирования таких клеток, о ключевых генах, необходимых для их работы, а также об основах их дифференцировки в различных направлениях. К настоящему времени, в зависимости от стадии эмбриогенеза, стали выделять несколько типов плюрипотентных стволовых клеток, которые принципиально отличаются друг от друга сигнальными путями, условиями культивирования и способностью к дифференцировке. Данная обзорная работа суммирует известные на сегодняшний день сведения о динамике плюрипотентности в эмбриогенезе, а также о соответствующих типах культивируемых плюрипотентных клеток.

Ключевые слова: плюрипотентность, эмбриональные стволовые клетки, ЭСК, ЭпиСК, эмбриогенез, Oct4, Sox2, Nanog

DOI: 10.31857/S0475145021060057

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки обнаруживаются на ранних стадиях эмбрионального развития мыши в эпибласте до и после имплантации, и дают начало трем основным линиям – эктодерме, мезодерме и энтодерме. В 1981 г. двум группам ученых удалось получить стабильную культуру плюрипотентных клеток мыши, которые были названы эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Возможность “удерживать” эти клетки в плюрипотентном состоянии открыла новые горизонты для изучения процессов дифференцировки, а также ключевых генов раннего развития и сигнальных каскадов. За последние 15 лет представления о данном типе клеток были значительно расширены. Стало очевидным, что несмотря на сохранение потенциала к дифференцировке, плюрипотентные клетки эпибласта существенно отличаются до и после имплантации. Во время этого процесса происходит переключение сигнальных путей, смена экспрессии ключевых маркеров, эпигенетические перестройки. Вследствие этих изменений эпибласт “созревает”, и становится готов к дальнейшей дифференцировке. Аналогично, в культуре также стали выделять несколько типов плюрипотентных клеток в зависимости от стадии развития. В данной обзорной работе обобщены имеющиеся на сегодняшний день данные о динамике плюрипотентных состояний *in vivo* и *in vitro*. Описаны процессы, которые приводят к дифференцировке этих клеток. Также приведены некоторые сведения об участии главных факторов плюрипотентности Oct4, Sox2 и Nanog в выборе программ дифференцировки.

НАИВНАЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) сущесвуют с 3.5 по 8 сут эмбрионального развития мыши. До 2.75 сут эмбрион представлен тотипотентными клетками – зиготой и, после дробления последней, бластомерами. Далее, к 4.5 сут развития происходит два события дифференцировки. Бластомеры дают начало трофэктодеме и клеткам внутренней клеточной массы (ВКМ). К 4.5 сут развития клетки ВКМ дифференцируются во внезародышевую (первичную) энтодерму и плюрипотентный эпибласт, способный затем дать начало трем основным зародышевым листкам. На начальном этапе этого процесса клетки ВКМ представляют собой смешанную популяцию (рис. 1), однако, уже в это время клеточные типы можно разделить по экспрессии специфических маркеров. Так, для клеток первичной энтодермы характерна экспрессия транскрипционного фактора

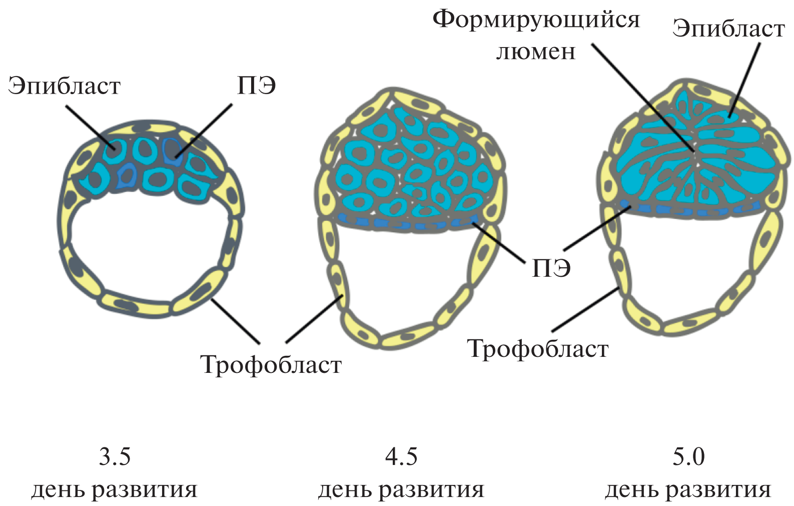


Рис. 1. Развитие эмбриона до имплантации. ПЭ – первичная энтодерма.

Gata6, в то время как в эпибласте обнаруживается высокий уровень Nanog (Bessonnard et al., 2014).

Развитие методов культивирования дало возможность выделять из эмбриона мыши клетки ВКМ и культивировать их *in vitro* с сохранением плюрипотентных свойств. Такой тип клеток стали называть эмбриональными стволовыми клетками мыши (мЭСК) (Evans et al., 1981; Martin, 1981). мЭСК также можно вводить в эмбрионы до имплантации, где они демонстрируют способность включаться в три зародышевых листка и линию половых клеток. При этом, мЭСК не способны включаться в эмбриональное развитие при введении в эмбрионы после имплантации (Huang et al., 2012). На сегодняшний день рутинное культивирование мЭСК происходит преимущественно в среде, содержащей лейкемия-ингибирующий фактор (ЛИФ, LIF) и сыворотку. Кроме того, в качестве подложки часто используют митотически инактивированные эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) (Niwa et al., 2009). Такие культуры, однако, неоднородны и демонстрирует значительную гетерогенность экспрессии маркеров и эпигенетических модификаций (Hayashi et al., 2008; Guo et al., 2016). Получить однородную культуру мЭСК удалось с применением так называемой “2i-LIF” среды. В ее состав входит ЛИФ, ингибитор GSK3 киназы (CHIR99021), являющейся негативным регулятором Wnt-сигнального пути, и ингибитор MEK-киназы (PD0325901), которая в свою очередь является неотъемлемым компонентом сигнального пути FGF/ERK (Ying et al., 2008). мЭСК в ходе культивирования в среде 2i-LIF по паттернам экспрессии основных маркеров и по эпигенетическим модификациям являются *in vitro*-аналогами плюрипотентного эпибласта мыши на 4.5 сут развития (Boroviak et al., 2014), и поэтому также называются “наивными”. Такие клетки характеризуются экспрессией Rex1, Klf4, Klf5 и Esrrb (Azami et al., 2018), наряду с основными факторами плюрипотентности – Oct4, Sox2 и Nanog (Chambers et al., 2007). Кроме того, подавление активности FGF/ERK приводит практически к полному удалению метилирования в CpG-островках генома (Habibi et al., 2013), что является, по-видимому, следствием подавления работы Dmnt1 – метил-трансферазы, поддерживающей паттерны метилирования при митотическом делении (Meyenn von et al., 2016). Вероятно, именно постепенным снижением доли метилированной ДНК в геноме можно объяснить тот факт, что для полного перехода к наивной плюрипотентности, мЭСК необходимо культивировать в среде 2i-LIF около 5–7 дней.

Наивные мЭСК имеют ограниченную способность дифференцироваться в клетки экстра-эмбриональных типов, таких как первичная энтодерма (Martin Gonzalez et al., 2016). При этом, недавно была показана возможность расширить “потенциал” мЭСК, используя модуляцию Wnt- и ингибирование FGF/ERK-, p38-, JNK-, SRC-сигнальных путей (Yang et al., 2017; Bayerl et al., 2021). Использование такого подхода позволило получить клетки, способные образовывать как плюрипотентный эпибласт, так и первичную энтодерму в бластоидах – *in vitro* моделях, воспроизводящих развитие эмбриона до имплантации (Sozen et al., 2019). Важно отметить, что ЭСК человека (чЭСК), изначально полученные в культуре (Thomson et al., 1998), соответствуют эпибласту после имплантации, то есть являются “праймированными” (речь об этом состоянии плюрипотентности пойдет далее). Относительно недавно была показана возможность получать наивные чЭСК (Chan et al., 2013), причем по паттернам экспрессии они оказались схожими как с клетка-

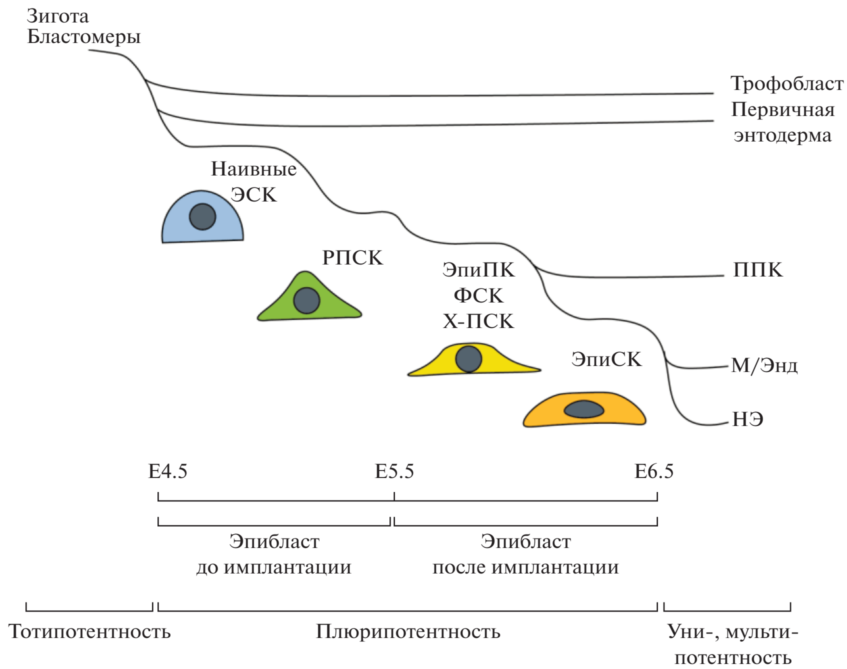


Рис. 2. Динамика плюрипотентных сотояний *in vitro*. РПСК – розеткоподобные стволовые клетки; ЭпиПК – эпибластоподобные клетки; ФСК – формативные стволовые клетки; ЭпиСК – эпибластные стволовые клетки; ППК – первичные половые клетки; М/Энд – мезодерма/энтодерма; НЭ – нейроэктодерма; E4.5, E5.5, E6.5 – дни эмбрионального развития мыши.

ми ВКМ (Theunissen et al., 2016), так и с мЭСК с расширенным потенциалом.

ПЕРЕХОД ОТ НАИВНОЙ К ПРАЙМИРОВАННОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Перед имплантацией эмбриона, в эпибласте происходит ряд морфологических и молекулярных перестроек, подготавливающих его к дальнейшему развитию. При этом, клетки эпибласта постепенно переходят из “наивного” в “праймированное” состояние плюрипотентности, становясь готовыми к дифференцировке в трех основных направлениях – в экто-, мезо-, и энтодерму (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Также, во время этого перехода выделяют несколько промежуточных состояний, имеющих свои отличительные особенности (табл. 1, рис. 2). Клетки наивного эпибласта непосредственно перед имплантаций становятся более поляризованными, в его центре формируется полость – люмен (рис. 1) (Shahbazi et al., 2017). Недавняя работа Дерка Берджа и соавторов (Neagu et al., 2020) показала возможность удерживать такие клетки в культуре, обозначенные авторами как розетко-подобные стволовые клетки (РПСК), на протяжении многих пассажей благодаря комбинации ЛИФ, IWP2 (ингибитор Wnt-пути) и PD0325901 ингибитор МЕК-киназы. Популяция РПСК демонстрировала одновременную экспрессию “праймированных” факторов Oct6, Otx2, а также “наивных” маркеров Klf4 и Esrrb. Поддержание РПСК в культуре обеспечивается, с одной стороны, ингибированием Wnt-сигнального пути, ответственного за поддержание наивной плюрипотентности, а с другой стороны, ингибированием FGF-пути, отвечающего за созревание бластоцисты.

Дальнейшее развитие эмбриона связано с имплантацией, происходящей на 5.5 сутки эмбриогенеза. Эпибласт окончательно утрачивает свойства наивной плюрипотентности, и постепенно становится “праймированным”, то есть готовым к дальнейшей дифференцировке. Кроме того, во время имплантации в клетках эпибласта прекращается экспрессия Klf4, Rex1 и Esrrb. *In vitro*, репрессия этих генов обеспечивается снижением активности Wnt-сигнального пути, что ведет к освобождению репрессирующего комплекса Tcf3 и подавлению его мишеней (Yi et al., 2011). Эпибласт только что имплантировавшегося эмбриона обладает рядом характеристик, позволяющих выделить еще одну промежуточную “формативную” стадию плюрипотентности (Smith, 2017). Ключевым свойством таких клеток является способность давать начало зародышевой линии – первичным половым клеткам (ППК). Интересно, что такая способность у клеток эпибласта сохраняется достаточно короткое время и теряется приблизительно к 6.5 сут эмбриогенеза, т.е. к на-

Таблица 1. Сравнение различных плюрипотентных клеточных линий мыши

Характеристика/статус		Наивные (2i)	ЭпиПК	РПСК	ФСК	Х-ПСК	Праймированные
Стабильность в культуре		Да	Нет	Да	Да	Да	Да
Сигнальные пути	FGF	Ингибирование	Активация	Ингибирование	Активация	Активация	Активация
	Nodal	–	Активация	–	Слабая активация	Активация	Активация
	Wnt	Активация	–	Ингибирование	Ингибирование	Активация	Ингибирование (для продолжительного культивирования)
	RA	–	–	–	Ингибирование	–	–
	LIF/STAT	Активация	–	–	–	–	–
	Неопределенный вклад	–	KORS	–	–	MEF	–
Возврат в состояние наивной плюрипотентности		–	Нет	Да	Нет	Не проверялось	Нет
Прямая дифференцировка в ППК		Нет	Да	Не проверялось	Да	Да	Нет
Эквивалент в эмбриогенезе		E4.5 эпибласт	E5.5 эпибласт	E5.0 эпибласт	E5.5–6.0 эпибласт	E5.5 эпибласт	E6.5–7.5 эпибласт
Наличие бивалентных промоторов		Небольшое	Высокое	Высокое	Высокое	Не проверялось	Высокое
Инактивация Х-хромосомы		XaXa	XaXi	XaXa	Не проверялось	XaXa	XaXi
Метилирование ДНК		Низкое	Промежуточное	Промежуточное	Не проверялось	Не проверялось	Высокое

Xa – активная Х-хромосома; Xi – неактивная Х-хромосома. Е – день эмбрионального развития.

чалу гаструляции (Ohinata et al., 2009). Главным маркером и регулятором формативной плюрипотентности является транскрипционный фактор Otx2, увеличение экспрессии которого происходит при выходе клеток из наивного состояния. Его функциональная роль выражена в первую очередь в перераспределении белка Oct4 на другие регуляторные элементы генома (Buecker et al., 2014; Yang et al., 2014). У самого гена *Pou5f1*, кодирующего Oct4, происходит переключение энхансеров с дистального на проксимальный (Choi et al., 2016). Кроме Oct4, переключение управляющих экспрессией регуляторных элементов показано для большого количества генов, транскрибирующихся как в наивных, так и праймированных плюрипотентных клетках (Factor et al., 2014). Кроме переключения регуляторных последовательностей происходит перестройка их регуляции через эпигенетические модификации. Клетки начинают экспрессировать *de novo* метилтрансферазы Dnmt-семейства. Предполагается, что такого рода эпигенетические модификации обеспечивают однонаправленность развития эмбриона. Кроме того, было обнаружено большое количество так называемых бивалентных генов, характеризующихся одновременным присутствием как репрессивной H3K4me3 метки, так и метки H3K27me3, ассоциированной с активацией транскрипции (Mas et al., 2018). Значительное количество бивалентных генов кодируют регуляторы дифференцировки и морфогенеза. Они не являются активно-транскрибирующимися в плюрипотентной клетке, при этом на них присутствует гипо-фосфорилированная форма РНК-полимеразы-II, вероятно, для быстрого перехода к элонгации транскрипции во время запуска программы дифференцировки (Tee et al., 2014). Гипо-фосфолирирование полимеразы происходит благодаря активности ERK-киназы. Во время дифференцировки бивалентные гены по-разному утрачивают либо активные, либо репрессивные метки хроматина, что зависит от выбранной траектории дифференцировки (Blanco et al., 2020).

Формативная плюрипотентность может быть воспроизведена *in vitro* несколькими способами. Такие клетки характеризуется целым набором черт, самой примечательной из которых является способность дифференцироваться в ППК под действием BMP4 (Hayashi et al., 2011; Wang et al., 2014). Одним из способов получения формативных плюрипотентных клеток *in vitro* является перевод с 2i-LIF среды, на среду, содержащую Fgf2 и Activin A. На второй день такого перехода клетки соответствуют эпибласту 5.5 сут развития, и называются эпибластоподобными стволовыми клетками (ЭпиПК) (Hayashi et al., 2011). Исходно, ЭпиПК являлись транзиторной популяцией, и при пролонгированном культивировании в среде с Ffg2 и Activin A переходили в праймированное состояние, характерное для эпибласта во время гаструляции (6.5–7.5 сутки развития), и, как следствие, теряли потенциал к дифференцировке в ППК. Недавние работы (Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021) открыли возможности получения клеток, стабильно сохраняющих свойства формативной плюрипотентности на протяжении длительного периода культивирования (30 и более пассажей). В одной из этих работ, стабильную линию “формативных” клеток (названных X-ПСК) удалось получить с помощью активации FGF-, Nodal- и Wnt-путей благодаря использованию Fgf2 совместно с Activin A и CHIR99021, соответственно (Yu et al., 2021). Полученные результаты являются довольно неожиданными, учитывая схожесть с протоколом культивирования ЭпиПК и наличие активатора Wnt, ответственного за индукцию дифференцировки в эмбрионе после имплантации. Тем не менее, среда в данном протоколе имеет не полностью определенный состав, так как клетки поддерживаются на митотически инактивированных эмбриональных фибробластах (МЭФ), дающих неизвестный вклад цитокинов в культуральную среду. Можно предположить, что именно МЭФ являются источником тех лигандов, которые обеспечивают удержание формативной плюрипотентности. В работе Остина Смита (Kinoshita et al., 2021) и коллег, была получена культура так называемых формативных стволовых клеток (ФСК). Среда для их культивирования содержала Activin A в низкой концентрации, а также ингибиторы XAV939 и BMS493, блокирующие сигнальные пути Wnt и ретиноевой кислоты соответственно. Было показано, что ФСК не могут вернуться к наивному состоянию плюрипотентности. Интересно, что данные клетки культивируют без добавления в культуральную среду Fgf2, что, однако, не исключает наличия аутокринных молекул Fgf. ФСК характеризует, как и ЭпиПК, способность генерировать *in vitro* аналоги первичных половых клеток. Таким образом, использование новых стабильных культур формативных плюрипотентных клеток может внести значительный вклад в понимание процессов, ведущих к разделению соматических линий и клеток зародышевого пути.

ПРАЙМИРОВАННАЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Клетки эпибласта на 6.5–7.5 сут эмбрионального развития являются праймированными (рис. 3), а их культивируемые *in vitro* аналоги называются эпибластными стволовыми клетками (ЭпиСК) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). При этом, по паттернам экспрессии генов, культивируемые ЭпиСК наиболее сходны с эпибластом на 7 сут развития (Kojima et al., 2014). Клетки на данном этапе уже коммитированы в направлении различ-

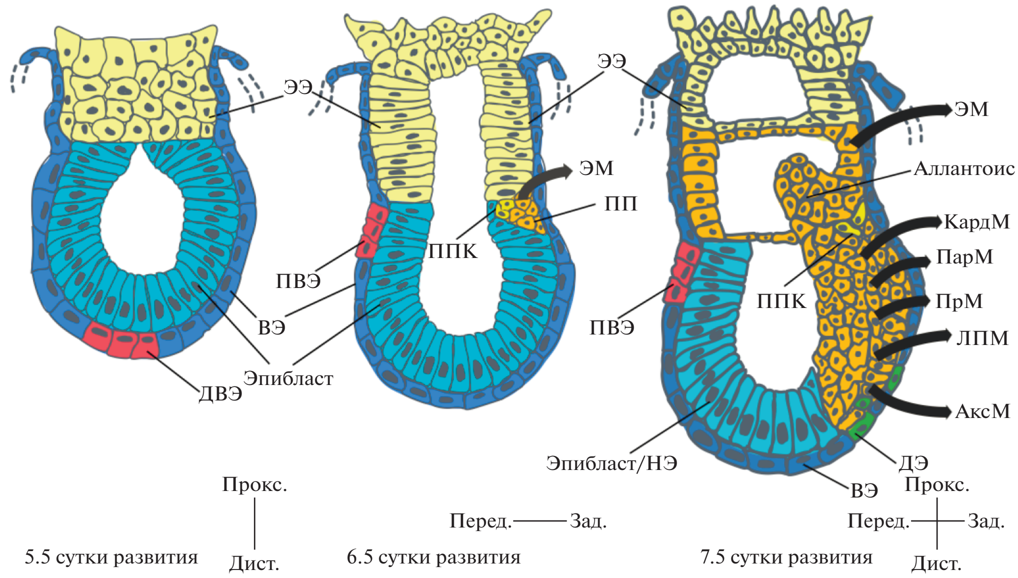


Рис. 3. Развитие эмбриона после имплантации. ДВЭ – дистальная висцеральная энтодерма; ПВЭ – передняя висцеральная энтодерма; ППК – первичные половые клетки; ЭЭ – экстра-эмбриональная эктодерма; ВЭ – висцеральная энтодерма; ДЭ – дефинитивная энтодерма; НЭ – нейроэктодерма; ПП – первичная полоска; ЭМ – экстраэмбриональная мезодерма; КардМ – кардиальная мезодерма; ПарМ – паракисальная мезодерма; ПрМ – промежуточная мезодерма; ЛПМ – мезодерма латеральной пластинки; АксМ – аксиальная мезодерма.

ных клеточных линий благодаря установившемуся сигнальному градиенту внутри эмбриона (Ben-Haim et al., 2006). Этим фактом может объясняться нестабильность ЭпиСК при пролонгированном культивировании без добавления ингибитора сигнального пути Wnt. Было предложено относить данный тип клеток к переднему эпибласту эмбриона во время гаструляции, являющегося предшественником нейроэктодермы. Это, однако, не согласуется с тем фактом, что ЭпиСК демонстрируют экспрессию некоторых маркеров первичной полоски (Brachyury, Eomes), что не наблюдается у переднего эпибласта (Pijuan-Sala et al., 2019). Объяснение может заключаться в различиях линий ЭпиСК (Kojima et al., 2014). Как уже упоминалось ранее, исходно, культивируемые чЭСК также являются праймированными и обладают множеством общих черт с ЭпиСК мыши (Morgani et al., 2017). Различные подходы к культивированию праймированных клеток обеспечивают получение линий с более выраженной территориальной специфичностью, чем у классических ЭпиСК. Например, благодаря использованию IWR, блокирующего Wnt-путь, а также Fgf2, активирующего FGF-сигнальный путь, была получена клеточная линия, преимущественно включающаяся в состав заднего эпибласта (Wu et al., 2015). Кроме того, была показана возможность получения линии ЭпиСК с большей предрасположенностью к нейрональной дифференцировке, чем классические ЭпиСК. Это достигалось путем добавления FGF-лигандов и инигибиторов Nodal-пути (SB431542) (Liu et al., 2018).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В НАПРАВЛЕНИИ ТРЕХ ЗАРОДЫШЕВЫХ ЛИСТКОВ

В эмбрионе после имплантации можно выделить проксимально расположенную трофоэктодерму, соединяющую плод с материнским организмом, и дистальную часть эмбриона, представленную эпибластом (рис. 3). При этом, весь эмбрион, включая трофэктодерму и эпибласт, покрыт висцеральной энтодермой. Еще до имплантации в висцеральной энтодерме можно выделить популяцию клеток, экспрессирующих Lefty1 – ингибитор сигнального пути Nodal (Liu et al., 2018). После имплантации эта группа клеток образует на конце эмбриона сигнальный центр – дистальную висцеральную энтодерму (ДВЭ), и вместе с трофэктодермой способствует установке дистально-проксимальной оси эмбриона (Rodriguez et al., 2005; Takaoka et al., 2006). Интересно, что по-видимому, этот процесс происходит в эмбрионе автономно, и не зависит от материнской части плаценты (Bedzhov et al., 2015). Дальнейшее развитие связано с миграцией клеток ДВЭ в будущий передний полюс эмбриона, и с образованием сигнального центра – передней висцеральной энтодермы (ПВЭ). Данный процесс завершается к 6.5 сут эмбрионального развития (Srinivas et al., 2004). ПВЭ определяет передне-заднюю ось эмбриона, выделяя Dkk1, Cer1 и Lefty1 (антогонисты Wnt-, BMP- и Nodal-cиналинга) (Perea-Gomez et al., 2002; Kimura-Yoshida et al., 2005), и формирует тем самым градиент активности этих сигнальных путей. В задней части эпибласта высокая активность вышеупомянутых путей приводит к образованию первичной полоски, вследствие развития которой образуется мезодерма и дефинитивная энтодерма (рис. 3). Передний эпибласт, примыкающий к ПВЭ, дает начало клеткам нейроэктодермы.

Первичная полоска – динамическая структура, образующаяся в задней части эпибласта, и расширяющаяся к переднему краю эмбриона (рис. 3). Клетки эпибласта в данной области претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и начинают мигрировать в формирующуюся первичную полоску (Francou, Anderson, 2020). Время и место миграции определяет выбор судьбы клетки. Клеточная популяция, расположенная на заднем конце эпибласта, в непосредственной близости от экстра-эмбриональной эктодермы, мигрирует проксимально от первичной полоски и образует экстраэмбриональную мезодерму (Saykali et al., 2019). В дальнейшем она развивается в хорион и алантоис. В состав последнего входит также небольшое число ППК-клеток (Ohinata et al., 2009). Первичная полоска далее расширяется к переднему краю, ее производными являются кардиальная мезодерма, параксиальная мезодерма, промежуточная мезодерма, мезодерма латеральной пластинки и аксиальная мезодерма (Ferretti, Hadjantonakis, 2019). Последняя, кроме того, содержит и клетки дефинитивной энтодермы, претерпевающей мезенхимально-эпителиальный переход. Важно отметить, что далее в образовании кишки принимает участие не только дефинитивная энтодерма, как считалось ранее, но и эмбриональная висцеральная энтодерма (Kwon et al., 2008; Viotti et al., 2014). Потомки обеих линий присутствуют в первичной кишке вплоть до середины периода эмбрионального развития, распределяясь при этом неравномерно (Nowotschin et al., 2019).

На ранних этапах развития первичной полоски, клетки, входящие в нее, подвергаются воздействию высоких концентраций BMP4, продуцируемого со стороны экстраэмбриональной трофэктодермы (Ben-Haim et al., 2006). По мере активного роста эмбриона и удаления первичной полоски от экстраэмбриональной трофэктодермы, действие BMP4 на передние области первичной полоски ослабевает, а ключевым регулятором дифференцировки в этой зоне становится Nodal (Costello et al., 2011). Кроме того, в передней первичной полоске экспрессируются антагонисты BMP– Noggin и Chordin (Pijuan-Sala et al., 2019). Важными участниками гаструляции являются Wnt- и FGF-сигнальные пути, нокауты по главным компонентам которых, приводят к отсутствию первичной полоски или к быстрому коллапсу ее развития (Guo, Li, 2007; Tortelote et al., 2013). Хорошей моделью для изучения различных градиентов сигнальных молекул являются 2d микропаттерны (Chhabra et al., 2019; Martyn et al., 2019). Несмотря на несоответствие морфологии и отсутствие активной миграции клеток, они, благодаря микрофлюидной технологии, точно воспроизводят дифференцировку различных линий клеток во время гаструляции (Morgani et al., 2018).

На переднем крае эпибласта после окончания формирования первичной полоски к 7.5 сут развития (рис. 3), происходит дифференцировка эпибласта в нейроэктодерму (Liu et al., 2018). Клетки переднего эпибласта, в отличие от клеток мезодермы и дефинитивной энтодермы, не переписывают эпигенетичесикие метки, такие как модификации гистонов и метилирование ДНК (Mohammed et al., 2017). Таким образом, считается, что нейрональная дифференцировка идет “по умолчанию”. Действительно, нокаут по основным компонентам BMP- и Wnt-сигнальных путей ведет к потере производных первичной полоски и преобладанию нейроэктодермальных производных. Такую дифференцировку “по умолчанию” могут обеспечивать бивалентные гены, функционирование которых зависит от хроматин-ремоделирующего комплекса PRC1/2 (Cruz-Molina et al., 2017). Нокаут по одному из его главных компонентов (Eed) приводит к фактическому отсутствию нейроэктодермы даже в условиях ингибирования сигнального пути Nodal (Grosswendt et al., 2020). Дальнейшее развитие нейроэктодермы идет в направлении нервной ткани и эпидермиса (Cajal et al., 2012).

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ OCT4, SOX2 И NANOG В ВЫБОРЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog являются ключевыми маркерами плюрипотентных стволовых клеток, и детектируются в эпибласте до, во время (кроме Nanog), и после имплантации, т.е. на стадиях наивной, формативной и праймированной плюрипотентности, соответственно (Morgani et al., 2017). Основная часть исследований, касающихся этих белков, направлена в первую очередь на изучение их функций в поддержании плюрипотентного состояния. Однако, в последнее время также появляются свидетельства об их активном участии и в ранней дифференцировке плюрипотентных клеток. В эмбриональном развитии, с началом гаструляции пространственная локализация Oct4, Sox2 и Nanog меняется: Sox2 экспрессируется в переднем эпибласте, который впоследствии даст начало нейроэктодерме, а Oct4 и Nanog – в заднем эпибаласте, то есть в области формирования первичной полоски (Mulas et al., 2018; Barral et al., 2019). Результаты *in vitro*-исследований функций Oct4, Sox2 и Nanog в ранней дифференцировке разнятся в зависимости от использования наивных мЭСК или праймированных чЭСК. Данные отличия вероятнее всего обусловлены соответствием этих клеток разным стадиям плюрипотентности – наивной для мЭСК, и более поздней праймированной для чЭСК, как уже было сказано ранее. Так, например, на мЭСК было показано, что снижение уровня Oct4 ведет к трофобластной дифференцировке (Niwa et al., 2000), тогда как увеличение экспрессии этого фактора приводило к спонтанной дифференцировке мЭСК в направлении мезо-, экто-, и энтодермы (Radzisheuskaya et al., 2013). В случае с чЭСК, оверэкспрессия Oct4 давала начало клеткам первичной полоски (мезоэнтодермы), а нокдаун приводил к эктодермальной дифференцировке (Wang et al., 2012). В регуляции экспрессии Oct4 в праймированных плюрипотентных клетках (в эпибласте после имплантации) была продемонстрирована роль сигнального пути FGF. Так, ингибирование ERK в праймированных ЭпиСК мыши влекло за собой подавление Oct4 и, как следствие, дифференцировку этих клеток в нейроэктодермальном направлении (Yu et al., 2018). Sox2 рассматривается прежде всего как фактор, способствующий нейроэктодермальному пути развития. После нокаута Sox2 в мЭСК, следовала дифференцировка в трофэктодерму (Masui et al., 2007), как и в случае с Oct4, в то время как оверэкспрессия Sox2 приводила к запуску нейроэктодермальной дифференцировки (Kopp et al., 2008). У чЭСК при оверэкспрессии этого фактора отмечалось усиление эктодермального пути развития и ингибирование дифференцировки в направлении первичной полоски (Wang et al., 2012). В 2019 году было показано, что, в то время как в ЭСК Oct4 и Sox2 в основном функционируют в виде гетеродимера, в нейроэктодермальной дифференцировке партнером Sox2 является белок Pax6. Как следствие, меняются и основные мишени Sox2 в геноме в сторону нейроэктодермальных (Zhang et al., 2019). Oct4 и Sox2 также рассматриваются как антагонисты в выборе начального мезоэнтодермального и нейроэктодермального пути развития, соответственно. При запуске мезоэнтодермального пути Sox2 снижает экспрессию, а Oct4 колокализуется с маркером первичной полоски Brachyury; в нейроэктодермальной дифференцировке, наоборот, Oct4 перестает экспрессироваться, а Sox2 колокализуется с нейроэктодермальным фактором Sox1 (Thomson et al., 2011). В этом ключе также обнаружились партнеры Oct4 и Sox2 – Nac1 и Tcf3, которые вместе координируют программу выбора двух описанных направлений дифференцировки (Malleshaiah et al., 2016). Кроме того, было показано, что Sox2 является антагонистом Brachyury в выборе мезоэнтодермального пути (Koch et al., 2017). Хотя работы на клеточных культурах указывают на роль Oct4 в развитии мезоэнтодермы, *in vivo* исследования не дают таких однозначных результатов. Так, подавление экспрессии Oct4 после 7.5 сут эмбриогенеза приводило к нарушению оси развития эмбриона, усилению развития дефинитивной энтодермы на фоне снижения образования мезодермы и, как следствие, к раннему летальному фенотипу (DeVeale et al., 2013; Mulas et al., 2018). Nanog, как и Oct4, блокирует нейроэктодермальную дифференцировку, при этом способствует развитию дефинитивной энтодермы через регуляцию гена Eomes (Teo et al., 2011). Подавление экспрессии Nanog в мЭСК приводило к трофэктодермальной, мезодермальной и эктодермальной дифференцировке (Ivanova et al., 2006), а оверэкспрессия белка отражалась в поддержании плюрипотентного статуса независимо от добавления LIF (Chambers et al., 2003). В чЭСК оверэкспрессия Nanog приводила к усилению экспрессии маркеров первичной полоски и к блокировке эктодермального пути, в то время как нокдаун, наоборот, усиливал эктодермальную дифференцировку (Teo et al., 2011). Кроме того, Nanog работает как супрессор нейроэктодермального пути развития через регуляцию гена *Pou3f1* (Barral et al., 2019). В целом, ввиду своего более позднего, праймированного статуса, культуры чЭСК, мЭпиПК и мЭпиСК являются более релевантными моделями для изучения дифференцировок в направлении трех зародышевых листков. Таким образом, для адекватного изучения направленной *in vitro* дифференцировки мЭСК в сторону экто-, мезо-, и энтодермы, их следует предварительно переводить в “праймированные” условия перед добавлением дифференцировочных факторов (BMP4, ActivinA и т.д.). Так, например, получить ППК из мЭСК удалось только после их предварительного перевода в среду с добавлением Fgf2 и Activin A (Hayashi et al., 2011).

Экспрессию факторов плюрипотентности Oct4, Sox2 и Nanog можно наблюдать и после начала гаструляции (Pijuan-Sala et al., 2019). В последующем развитии все три фактора обнаруживаются в первичных половых клетках (Zhang et al., 2018), Oct4 детектируется в мезодерме, вплоть до 8.25 сут развития (Yeom et al., 1996; Pijuan-Sala et al., 2019), а Sox2 после начала гаструляции работает как регулятор нейроэктодермального развития (Mittnenzweig et al., 2021). Играя важную роль в поддержании плюрипотентности и последующего раннего развития, Oct4, Nanog и Sox2, по-видимому, также принимают участие в спецификации клеток краниального нервного гребня. Данный тип клеток является прямым потомком эктодермы, но при этом они способны дифференцироваться в мезенхиму или глиальные клетки. Вероятно, такое “репрограммирование” обеспечивается коротким всплеском экспрессии этих факторов плюрипотентности (Zalc et al., 2021). Вопрос о том, имеют ли место подобные события во время других периодов развития, пока остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных, становится очевидно, что клетки плюрипотентного эпибласта не являются стабильной недифференцированной линией. Напротив, во время имплантации наблюдается динамический процесс, который подготавливает эпибласт к дальнейшей дифференцировке в трех основных направлениях. На данный момент известно по крайней мере о четырех различных типах плюрипотентных клеток, которые имеют стабильно культивируемые *in vitro* аналоги. Учитывая то, что дифференцировка запускается из позднего “праймированного” состояния, многие результаты прошлых лет, полученные с использованием “наивных” мЭСК, требуют пересмотра. Для адекватного изучения дифференцировки мЭСК в культуре и для экстраполяции данных на процессы, происходящие *in vivo*, необходимо моделировать сигнальное окружение, которое соответствует таковому у эпибласта после имплантации. К примеру, первичные половые клетки из мЭСК удалось получить только путем предварительной смены стандартной среды на “праймированную”. Также, как видно из заключительного раздела, многие данные, например, о функциях Oct4, Sox2 и Nanog отличаются, в зависимости от использования наивных мЭСК или праймированных чЭСК. Несмотря на бурное развитие данной темы, остаются невыясненными некоторые вопросы. Например, как именно происходит дифференцировка в сторону нейроэктодермы? Известно, что данный выбор происходит “по умолчанию” в отсутствии сигнальных молекул, но не ясно, что заставляет клетки эпибласта выходить из плюрипотентного состояния. Также данные об участии факторов Oct4, Sox2 и Nanog в ранней дифференцировке остаются весьма фрагментарными. Учитывая, например, что оверэкспрессия Oct4 и Sox2 не усиливает плюрипотентный статус клеток, а наоборот ведет к их дифференцировке, необходимо выяснить, происходит ли это по причине активации определенных генов мишеней или имеют место специфические модификации данных белков. Решение этих вопросов улучшит наше понимание механизмов, лежащих в основе раннего эмбриогенеза, а также позволит эффективнее использовать плюрипотентные стволовые клетки в регенеративной медицине.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-00072.

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

М.Н. Гордеев написал основную часть текста, подбирал литературу и делал иллюстрации. Е.И. Бахмет подбирал литературу, написал введение и заключение, редактировал текст. А.Н. Томилин редактировал текст и вносил заключительные правки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Azami T., Matsumoto K., Jeon H. et al. Klf5 suppresses ERK signaling in mouse pluripotent stem cells // PLoS One. 2018. V. 13. № 11. P. e0207321.

Barral A., Rollan I., Sanchez-Iranzo H. et al. Nanog regulates Pou3f1 expression at the exit from pluripotency during gastrulation // Biol. Open. 2019. V. 8. № 11. P. bio046367.

Bayerl J., Ayyash M., Shani T. et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. P. 1–17.

Bedzhov I., Bialecka M., Zielinska A. et al. Development of the anterior-posterior axis is a self-organizing process in the absence of maternal cues in the mouse embryo // Cell Res. 2015. V. 25. № 12. P. 1368–1371.

Ben-Haim N., Lu C., Guzman-Ayala M. et al. The Nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4 // Dev. Cell. 2006. V. 11. № 3. P. 313–323.

Bessonnard S., De Mot L., Gonze D. et al. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network // Dev. 2014. V. 141. № 19. P. 3637–3648.

Blanco E., González-Ramírez M., Alcaine-Colet A. et al. The bivalent genome: Characterization, structure, and regulation // Trends Genet. 2020. V. 36. № 2. P. 118–131.

Boroviak T., Loos R., Bertone P. et al. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification // Nat. Cell Biol. 2014. V. 16. № 6. P. 513–525.

Brons I.G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195.

Buecker C., Srinivasan R., Wu Z. et al. Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 6. P. 838–853.

Cajal M., Lawson K.A., Hill B. et al. Clonal and molecular analysis of the prospective anterior neural boundary in the mouse embryo // Development. 2012. V. 139. № 2. P. 423–436.

Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // Cell. 2003. V. 113. № 5. P. 643–655.

Chambers I., Silva J., Colby D. et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development // Nature. 2007. V. 450. № 7173. P. 1230–1234.

Chan Y.S., Göke J., Ng J.H. et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast // Cell Stem Cell. 2013. V. 13. № 6. P. 663–675.

Chhabra S., Liu L., Goh R. et al. Dissecting the dynamics of signaling events in the BMP, WNT, and NODAL cascade during self-organized fate patterning in human gastruloids // PLoS Biol. 2019. V. 17. № 10. P. e3000498.

Choi H.W., Joo J.Y., Hong Y.J. et al. Distinct enhancer activity of Oct4 in naive and primed mouse pluripotency // Stem Cell Reports. 2016. V. 7. № 5. P. 911–926.

Costello I., Pimeisl I.M., Dräger S. et al. The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation // Nat. Cell Biol. 2011. V. 13. № 9. P. 1084–1091.

Cruz-Molina S., Respuela P., Tebartz C. et al. PRC2 facilitates the regulatory topology required for poised enhancer function during pluripotent stem cell differentiation // Cell Stem Cell. 2017. V. 20. № 5. P. 689–705.

DeVeale B., Brokhman I., Mohseni P. et al. Oct4 is required ~E7.5 for proliferation in the primitive streak // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 11. P. e1003957.

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.

Factor D.C., Corradin O., Zentner G.E. et al. Epigenomic comparison reveals activation of "seed" enhancers during transition from naive to primed pluripotency // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 6. P. 854–863.

Ferretti E., Hadjantonakis A.K. Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. V. 61. P. 110–116.

Francou A., Anderson K.V. The Epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer // Annu. Rev. Cancer Biol. 2020. V. 4. P. 197–220.

Grosswendt S., Kretzmer H., Smith Z.D. et al. Epigenetic regulator function through mouse gastrulation // Nature. 2020. V. 584. № 7819. P. 102–108.

Guo G., Pinello L., Han X. et al. Serum-based culture conditions provoke gene expression variability in mouse embryonic stem cells as revealed by single-cell analysis // Cell Rep. 2016. V. 14. № 4. P. 956–965.

Guo Q., Li J.Y.H. Distinct functions of the major Fgf8 spliceform, before and during mouse gastrulation // Development. 2007. V. 134. № 12. P. 2251–2260.

Habibi E., Brinkman A.B., Arand J. et al. Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2013. V. 13. № 3. P. 360–369.

Hayashi K., de S. Lopes S.M.C., Tang F. et al. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. № 4. P. 391–401.

Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K. et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells // Cell. 2011. V. 146. № 4. P. 519–532.

Huang Y., Osorno R., Tsakiridis A. et al. In vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation // Cell Rep. 2012. V. 2. № 6. P. 1571–1578.

Ivanova N., Dobrin R., Lu R. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference // Nature. 2006. V. 442. № 7102. P. 533–538.

Kimura-Yoshida C., Nakano H., Okamura D. et al. Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm // Dev. Cell. 2005. V. 9. № 5. P. 639–650.

Kinoshita M., Barber M., Mansfield W. et al. Capture of mouse and human stem cells with features of formative pluripotency // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 3. P. 453–471.

Koch F., Scholze M., Wittler L. et al. Antagonistic activities of Sox2 and brachyury control the fate choice of neuro-mesodermal progenitors // Dev. Cell. 2017. V. 42. № 5. P. 514–526.e7.

Kojima Y., Kaufman-Francis K., Studdert J.B. et al. The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 1. P. 107–120.

Kopp J.L., Ormsbee B.D., Desler M. et al. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells // Stem Cells. 2008. V. 26. № 4. P. 903–911.

Kwon G.S., Viotti M., Hadjantonakis A.K. The endoderm of the mouse embryo arises by dynamic widespread intercalation of embryonic and extraembryonic lineages // Dev. Cell. 2008. V. 15. № 4. P. 509–520.

Liu C., Wang R., He Z. et al. Suppressing Nodal signaling activity predisposes ectodermal differentiation of epiblast stem cells // Stem Cell Reports. 2018. V. 11. № 1. P. 43–57.

Malleshaiah M., Padi M., Rue P. et al. Nac1 coordinates a sub-network of pluripotency factors to regulate embryonic stem cell differentiation // Cell Rep. 2016. V. 14. № 5. P. 1181–1194.

Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12 II. P. 7634–7638.

Martin Gonzalez J., Morgani S.M., Bone R.A. et al. Embryonic stem cell culture conditions support distinct states associated with different developmental stages and potency // Stem Cell Reports. 2016. V. 7. № 2. P. 177–191.

Martyn I., Siggia E.D., Brivanlou A.H. Mapping cell migrations and fates in a gastruloid model to the human primitive streak // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. V. 66. P. 89–96.

Mas G., Blanco E., Ballaré C. et al. Promoter bivalency favors an open chromatin architecture in embryonic stem cells // Nat. Genet. 2018. V. 50. № 10. P. 1452–1462.

Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 625–635.

Meyenn F. von, Iurlaro M., Habibi E. et al. Impairment of DNA methylation maintenance is the main cause of global demethylation in naive embryonic stem cells // Mol. Cell. 2016. V. 62. № 6. P. 848–861.

Mittnenzweig M., Mayshar Y., Cheng S. et al. Article A single-embryo, single-cell time-resolved model for mouse gastrulation A single-embryo, single-cell time-resolved model for mouse gastrulation // Cell. 2021. V. 184. № 11. P. 2825–2842.e22.

Mohammed H., Hernando-Herraez I., Savino A. et al. Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation // Cell Rep. 2017. V. 20. № 5. P. 1215–1228.

Morgani S.M., Metzger J.J., Nichols J. et al. Micropattern differentiation of mouse pluripotent stem cells recapitulates embryo regionalized cell fate patterning // Elife. 2018. V. 7. № 7. P. e32839.

Morgani S., Nichols J., Hadjantonakis A.K. The many faces of pluripotency: *in vitro* adaptations of a continuum of *in vivo* states // BMC Dev Biol. 2017. V. 17. № 1. P. 1–20.

Mulas C., Chia G., Jones K.A. et al. Oct4 regulates the embryonic axis and coordinates exit from pluripotency and germ layer specification in the mouse embryo // Development. 2018. V. 145. № 12. P. 1–13.

Neagu A., van Genderen E., Escudero I. et al. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // Nat. Cell Biol. 2020. V. 22. № 5. P. 534–545.

Niwa H., Ogawa K., Shimosato D. et al. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells // Nature. 2009. V. 460. № 7251. P. 118–122.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // Nat. Genet. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.

Nowotschin S., Setty M., Kuo Y.Y. et al. The emergent landscape of the mouse gut endoderm at single-cell resolution // Nature. 2019. V. 569. № 7756. P. 361–367.

Ohinata Y., Ohta H., Shigeta M. et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice // Cell. 2009. V. 137. № 3. P. 571–584.

Perea-Gomez A., Vella F.D.J., Shawlot W. et al. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks // Dev. Cell. 2002. V. 3. № 5. P. 745–756.

Pijuan-Sala B., Griffiths J.A., Guibentif C. et al. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis // Nature. 2019. V. 566. № 7745. P. 490–495.

Radzisheuskaya A., Chia Gle B., dos Santos R.L. et al. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages // Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. № 6. P. 579–590.

Rodriguez T.A., Srinivas S., Clements M.P. et al. Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm // Development. 2005. V. 132. № 11. P. 2513–2520.

Saykali B., Mathiah N., Nahaboo W. et al. Distinct mesoderm migration phenotypes in extra-embryonic and embryonic regions of the early mouse embryo // Elife. 2019. V. 8. P. e42434.

Shahbazi M.N., Scialdone A., Skorupska N. et al. Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos // Nature. 2017. V. 552. P. 239–243.

Smith A. Formative pluripotency: The executive phase in a developmental continuum // Dev. 2017. V. 144. № 3. P. 365–373.

Sozen B., Cox A.L., De Jonghe J. et al. Self-organization of mouse stem cells into an extended potential blastoid // Dev. Cell. 2019. V. 51. № 6. P. 698–712.e8.

Srinivas S., Rodriguez T., Clements M. et al. Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm // Development. 2004. V. 131. № 5. P. 1157–1164.

Takaoka K., Yamamoto M., Shiratori H. et al. The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation // Dev. Cell. 2006. V. 10. № 4. P. 451–459.

Tee W.W., Shen S.S., Oksuz O. et al. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs // Cell. 2014. V. 156. № 4. P. 678–690.

Teo A.K.K., Arnold S.J., Trotter M.W.B. et al. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin // Genes Dev. 2011. V. 25. № 3. P. 238–250.

Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // Nature. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.

Theunissen T.W., Friedli M., He Y. et al. Molecular criteria for defining the naive human pluripotent state // Cell Stem Cell. 2016. V. 19. № 4. P. 502–515.

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.

Thomson M., Liu S.J., Zou L.N. et al. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers // Cell. 2011. V. 14. № 6. P. 875–889.

Tortelote G.G., Hernández-Hernández J.M., Quaresma A.J.C. et al. Wnt3 function in the epiblast is required for the maintenance but not the initiation of gastrulation in mice // Dev. Biol. 2013. V. 374. № 1. P. 164–173.

Viotti M., Nowotschin S., Hadjantonakis A.K. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation // Nat. Cell Biol. 2014. V. 16. № 12. P. 1146–1156.

Wang R.N., Green J., Wang Z. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases // Genes Dis. 2014. V. 1. № 1. P. 87–105.

Wang Z., Oron E., Nelson B. et al. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. № 4. P. 440–454.

Wu J., Okamura D., Li M. et al. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency // Nature. 2015. V. 521. № 7552. P. 316–321.

Yang J., Ryan D.J., Wang W. et al. Establishment of mouse expanded potential stem cells // Nature. 2017. V. 550. № 7676. P. 393–397.

Yang S.H., Kalkan T., Morissroe C. et al. Otx2 and Oct4 drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naive pluripotency // Cell Rep. 2014. V. 7. № 6. P. 1968–1981.

Yeom Y.Il, Fuhrmann G., Ovitt C.E. et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells // Development. 1996. V. 122. № 3. P. 881–894.

Yi F., Pereira L., Hoffman J.A. et al. Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal // Nat. Cell Biol. 2011. V. 13. № 7. P. 762–770.

Ying Q.L., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // Nature. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.

Yu L., Wei Y., Sun H.X. et al. Derivation of intermediate pluripotent stem cells amenable to primordial germ cell specification // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 3. P. 550–567.e12.

Yu Y., Wang X., Zhang X. et al. ERK inhibition promotes neuroectodermal precursor commitment by blocking self-renewal and primitive streak formation of the epiblast // Stem Cell Res. Ther. 2018. V. 9. № 1. P. 2.

Zalc A., Sinha R., Gulati G.S. et al. Reactivation of the pluripotency program precedes formation of the cranial neural crest // Science. 2021. V. 371. № 6529.

Zhang M., Leitch H.G., Tang W.W.C. et al. Esrrb complementation rescues development of nanog-null germ cells // Cell Rep. 2018. V. 22. № 2. P. 332–339.

Zhang S., Bell E., Zhi H. et al. OCT4 and PAX6 determine the dual function of SOX2 in human ESCs as a key pluripotent or neural factor // Stem Cell Res. Ther. 2019. V. 10. № 1. P. 1–14.

Pluripotency Dynamics during Embryogenesis and in Cell Culture

M. N. Gordeev[1], E. I. Bakhmet[1], and A. N. Tomilin[1, *]

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

**e-mail: a.tomilin@incras.ru*

The early embryonic development of mice and humans is characterized by the presence of pluripotent cells, which give rise to all tissues of the developing embryo. About 40 years ago, these cells were isolated and maintained in culture in a stable pluripotent state. Since then, a plethora of data regarding the mechanisms underlying the functioning of these cells, key genes necessary for their work, as well as their differentiation into various cell types. Nowadays, depending on the stage of embryogenesis, multiple types of pluripotent stem cells can be distinguished, and these types fundamentally differ from each other in signaling, culture condition dependendence, and differentiation abilities. This review summarizes currently available information on the dynamics of pluripotency during embryogenesis as well as in cultured pluripotent cells.

Keywords: pluripotency, embryonic stem cells, ESCs, EpiSCs, embryogenesis, Oct4, Sox2, Nanog

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 441–452

ОБЗОРЫ

УДК 575.8

ФЕНОМЕН ЭВОЛЮЦИОННОГО “САМОЗАРОЖДЕНИЯ” ГЕНОВ

© 2021 г. Р. О. Черезов[a], Ю. Е. Воронцова[a], О. Б. Симонова[a, *]

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

**e-mail: osimonova@hotmail.com*

Поступила в редакцию 18.06.2021 г.
После доработки 20.07.2021 г.
Принята к публикации 25.07.2021 г.

Вопрос возникновения и эволюции новых генов всегда интересовал эволюционных генетиков. Наиболее очевидными механизмами их формирования являются разного рода хромосомные и межгенные перестройки, подразумевающие использование в качестве исходного материала уже существующие гены. Возможность происхождения полностью функционального гена из некодирующей ДНК, т.е. *de novo*, не отвергалась, но до последнего времени практически сводилась к нулю. Тем не менее, в 1996 г. после анализа генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были получены первые экспериментальные доказательства возможности формирования генов *de novo*. Спустя 10 лет, гены, не имеющие гомологов, предполагаемо возникшие *de novo*, были найдены у дрозофилы. Относительно высокая вероятность возникновения генов *de novo*, оцененная в биоинформационных исследованиях, подняла интерес к этой теме и сделала актуальным их поиск. Сейчас количество работ, посвященных проблеме возникновения генов *de novo* у разных организмов, включая человека, постоянно растет, демистифицируя этот феномен. Тем не менее, остается много вопросов, требующих теоретического и практического исследования. Данный обзор посвящен проблеме поиска и характеристике генов, возникших *de novo*, а также предполагаемым механизмам их возникновения.

Ключевые слова: ген, эволюция, *de novo*

DOI: 10.31857/S0475145021060033

Вдали от равновесия могут возникать
новые процессы самоорганизации.
И. Пригожин, И. Стенгерс
“Порядок из хаоса”

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время основным механизмом формирования новых генов в эволюции считались дупликации существующих генов у предковых организмов с последующей дивергенцией возникших копий (Haldane, 1933; Muller, 1935; Ohno et al., 1968; Ohno, 1970). Зарождение генов *de novo* внутри некодирующих районов ДНК, то есть “с нуля”, считали маловероятным событием (Jacob, 1977). Тем не менее, такие предположения высказывались в работах Граса и Оно (Grasse, 1977; Ohno, 1984). В 1996 году были получены первые экспериментальные доказательства возможности формирования генов *de novo* (Dujon, 1996). В этой работе был проведен анализ генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в результате которого были выявлены гены, не имеющие гомологов у других видов. Затем появилась серия работ, выполненных на разных видах плодовой мухи *Drosophila* (Levine et al., 2006; Begun et al., 2006, 2007). В работе Бегана (Begun et al., 2006) был проанализирован транскриптом придаточных желез репродуктивной системы самцов дрозофил видов *D. yakuba* и *D. erecta*. В результате обнаружили 20 видоспецифичных генов, которые вероятнее всего возникли *de novo*, без участия дупликаций, или других перестроек предковых последовательностей. У *D. melanogaster* и *D. simulans* было найдено 5 таких генов (Levine et al., 2006). Затем при анализе библиотеки кДНК, полученной из семенников *D. erecta* и *D. yakuba* были обнаружены еще 7 уникальных генов, возникших *de novo* (Begun et al., 2007). Параллельно с этим у *S. cerevisiae* было найдено 99 генов, специфичных только для этого вида и, вероятно, возникших *de novo* (Nishida, 2006). Также у *S. cerevisae* в 2008 г. был обнаружен возникший *de novo* ген *BSC4*, кодирующий белок не имеющий гомологов даже у близкородственных видов (Cai et al., 2008). Авторы предположили, что новый ген может являться компонентом сигнального пути репарации ДНК. В 2009 г. у *Arabidopsis thaliana* был охарактеризован первый ген (*QQS*), возникший *de novo* и предположительно участвующий в метаболизме крахмала (Li et al., 2009). У домовой мыши в 2009 г. был описан ген *Poldi,* возникший *de novo* и кодирующий только длинную некодирующую РНК (lncRNA). По данным авторов, этот ген возник в межгенном районе, который присутствует в геноме многих млекопитающих, включая человека (Heinen et al., 2009). Тем не менее транскрипты *Poldi* детектируются только в семенниках рода *Mus musculus*, на основании чего авторы заключили, что этот ген возник *de novo*, а не в результате геномных перестроек. В 2009 г. у человека были обнаружены три гена (*CLLU1*, *C22orf45*, *DNAH10OS*), возникшие уже после разделения предков современных шимпанзе и *Homo sapiens* (Knowles, McLysaght, 2009). Один из этих генов (*CLLU1*) предположительно связан с развитием хронического лимфолейкоза. Позже, поиск функциональных генов, возникших *de novo* у человека, выявил ген *FLJ33706* предположительно связанный с развитием никотиновой зависимости и болезнью Альцгеймера (Li et al., 2010).

Сейчас количество работ, посвященных проблеме возникновения генов *de novo* у разных организмов, постоянно растет. Несмотря на это, в отношении многих примеров остается открытым вопрос о том, являются ли эти гены действительно возникшими *de novo*. Тем не менее, учитывая все имеющиеся данные, можно с уверенностью сказать: возникновение *de novo* – является самостоятельным реально существующим механизмом формирования новых генов в ходе эволюции (Neme, Tautz, 2013; Oss, Carvunis, 2019).

Следует отметить, что в настоящее время в список генов, возникших *de novo*, часто включают гены-сироты (orphan genes) (Schlötterer, 2015; Zhang et al., 2019). Однако, гены-сироты – это более широкое понятие, объединяющее таксон-специфические гены, которые являются уникальными для определенного таксономического уровня. Механизмами возникновения генов-сирот могут быть: дупликации предкового гена и быстрая дивергенция его копий, в результате которой становится невозможным обнаружить ее гомологов (Tautz, Domazet-Lošo, 2011); экзаптация мобильных элементов (Toll-Riera et al., 2009); горизонтальный перенос генов (Husnik, McCutcheon, 2018); сдвиг кодирующей белок рамки считывания, приводящий к возникновению совершенно нового белка (Neme, Tautz, 2013) и собственно возникновение генов *de novo* в ранее некодирующих участках генома (Schlötterer, 2015). Таким образом, именно гены, которые возникли *de novo*, входят в группу генов-сирот, а не наоборот. Этим генам и будет посвящен данный обзор.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОВ, ВОЗНИКШИХ *DE NOVO*

Для поиска генов, возникших *de novo*, используют геномную филостратиграфию (Domazet-Loso et al., 2007) и подходы, в основе которых лежит синтения генов.

В геномной филостратиграфии сравниваются последовательности гомологов исследуемого гена у близкородственных и отдаленных видов, полученные с помощью программного обеспечения BLAST или его аналогов (Altschul et al., 1990). В результате этого анализа становится возможным определить возраст гена, т.е. участок на филогенетическом древе, соответствующий появлению общего предка для видов, у которых обнаруживаются гомологи изучаемого гена. Если же в ходе филостратиграфического анализа его гомологи у близкородственных видов не обнаруживаются, то он считается новым или таксон-специфичным, в зависимости от того, в какой группе видов проводили поиск. Использование филостратиграфического анализа для поиска генов, возникших *de novo*, ограничено имеющимися данными о геномах, родственных исследуемому, и используемыми критериями поиска в BLAST (McLysaght, Hurst, 2016). Так, например, часто нельзя исключить того, что исследуемый ген возник после дупликации предкового гена и последующей быстрой дивергенции его копии, не определяемой как гомолог при использовании поиска в BLAST. На обнаружение гомологов гена также влияет его длина и длина открытой рамки считывания, так как короткие и быстро эволюционирующие белки могут быть не обнаружены у родственных видов, даже если они реально существуют (Elhaik, 2006; Moyers, Zhang, 2015; Weisman, 2020). Поэтому для более успешного обнаружения филогенетически древних гомологов используются более чувствительные алгоритмы поиска такие, как CS-BLAST, PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) и скрытые модели Маркова (Potter et al., 2018). Например, при поиске генов, возникших *de novo* методом геномной филостратиграфии было обнаружено 25 новых генов у *Saccharomyces cerevisiae* (Carvunis et al., 2012), 781 ген у *Mus musculus* (Neme, Tautz, 2013), 84 гена у *Mus musculus* (Wilson et al., 2017). Однако в других исследованиях, при моделировании эволюции геномов нескольких видов дрожжей *Saccharomyces* и мух *Drosophila* было показано, что, филостратиграфический подход не смог обнаружить ортологи в родственных видах для 11% из 5878 моделей генов дрожжей и для 13.9% из 6695 моделей генов мух, и эти гены ошибочно отнесли к генам, возникшим *de novo* (Moyers, Zhang, 2015, 2016).

В сравнении с геномной филостратиграфией, более достоверные данные при поиске генов, возникших *de novo*, можно получить используя подходы, основанные на анализе консервативных синтенных участков (синтенных блоков), так как они позволяют обнаружить в геномах видов аутгрупп участки, на основе которых возникли предполагаемые новые гены (Chen, 2010; Tautz, Domazet-Lošo, 2011; McLysaght, Hurst, 2016). Выравнивания синтенных последовательностей обычно делают относительно выбранных консервативных маркеров: генов, *k*-меров и, иногда, экзонов (Ghiurcutam, Moret 2014; Gehrmann, Reinders, 2015). Отсутствие реальной экспрессии белка или предполагаемой рамки считывания в синтенном районе в аутгруппе позволяет с высокой степенью уверенности утверждать, что исследуемый ген действительно возник *de novo* (McLysaght, Hurst, 2016). Наиболее убедительным доказательством происхождения гена *de novo* является обнаружение специфической мутации, которая привела к трансформации ранее некодирующего участка генома в кодирующий. Такие данные обычно получают в ходе анализа микросинтенных районов у близкородственных видов (Oss, Carvunis, 2019). Одним из препятствий к использованию методов, основанных на анализе синтенных блоков, является сложность выявления синтении в филогенетически значительно удаленных друг от друга геномах. Также сложности возникают, если исследуемые геномы фрагментированы (Liu et al., 2018) или в исследуемой эволюционной линии наблюдается высокая частота спонтанных мутаций (Ranz et al., 2001). С помощью анализа консервативных синтенных участков были обнаружены возникшие *de novo* гены человека: *FLJ33706* (Li et al., 2010), *CLLU1*, *C22orf45*, *DNAH10OS* (Knowles, McLysaght, 2009); 16 новых генов у *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 2010); ген *Poldi* у *Mus musculus* (Heinen et al., 2009); ген *MDF1* у *Saccharomyces cerevisiae* (Li et al., 2010). Тем не менее, наибольшей достоверностью считаются исследования, в которых анализ синтенных участков в геномах аутгрупп совмещают с методом геномной филостратиграфии.

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНОВ, ВОЗНИКШИХ *DE NOVO*

Возникшие *de novo* гены, обнаруженные у разных видов, обладают некоторыми общими характеристиками. В сравнении с другими, эти гены быстрее эволюционируют (Toll-Riera et al., 2009; Reinhardt et al., 2013), кодируют более короткие ОРС (Zhao et al., 2014), содержат меньше экзонов (Neme, Tautz 2013; Palmieri et al., 2014) и много микросателлитных последовательностей (Guo et al., 2007; Toll-Riera et al., 2009; Palmierit al., 2014). Биоинформатический анализ предпочитаемых кодонов в генах, возникших *de novo,* показал, что в их последовательностях они встречаются чаще чем в последовательностях генов нкРНК и межгенных регионах (Toll-Riera et al., 2009; Palmieri, et al., 2014). Также отмечают следующие общие свойства возникших *de novo* генов: более низкий уровень экспрессии, по сравнению с другими генами, но более высокий, по сравнению с межгенными регионами (Donoghue et al., 2011; Palmieri, et al., 2014; Zhao et al., 2014; Heames et al., 2020), высокую тканеспецифичность (Levine et al., 2006; Toll-Riera et al., 2009; Donoghue et al., 2011; Heames et al., 2020) и частую локализацию на X-хромосоме (Levine et al., 2006; Palmieri et al., 2014; Zhao et al., 2014). Так, относительно высокий уровень экспрессии генов, возникших *de novo*, по сравнению с другими тканями был обнаружен: в репродуктивной системе самцов плодовой мушки *Drosophila* (Begun et al., 2006, 2007; Zhao et al., 2014); семенниках, селезенке и тимусе домовой мыши (Bekpen et al., 2018); семенниках и коре головного мозга человека (Wu et al., 2011; Pertea et al., 2018). Белковые продукты *de novo*-генов могут восприниматься иммунной системой как чужеродные, что будет приводить к аутоиммунной реакции, поэтому предполагают, что более высокий уровень экспрессии новых генов в мозге и семенниках млекопитающих обеспечивается иммунными привилегиями этих органов, а экспрессия в селезенке и тимусе предшествует экспрессии в других тканях, так как в этих органах происходит адаптация новых белков к иммунному ответу (Bekpen, Tautz, 2018).

В ряде работ показано, что гены, возникшие *de novo*, часто кодируют белки, неспособные формировать выраженную трехмерную структуру, т.е. для этих белков характерна высокая внутренняя неупорядоченность. Некоторые авторы предполагают, что это свойство связано с высоким содержанием нуклеотидов G и C в геномах исследуемых организмов, так как GC-богатые последовательности кодируют более неупорядоченные белки (Basile et al., 2017). Примерами этому являются исследования GC-богатых геномов плодовой мушки *Drosophila*, простейшего *Leishmania major* и дрожжей *Lachancea*, для которых продемонстрирована высокая внутренняя неупорядоченность белков, кодируемых генами, возникшими *de novo* (Bitard-Feildel et al., 2015; Mukherjee et al., 2015; Wilson et al., 2017; Heames et al., 2020), в то время как уровень внутренней неупорядоченности белков, кодируемых генами, возникшими *de novo* в GC-бедном геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, низкий (Carvunis et al., 2012; Ekman, Elofsson, 2010; Basile et al., 2017).

Также одной из гипотез, объясняющих высокий уровень неупорядоченности белков, кодируемых генами, возникшими *de novo*, является гипотеза преадаптации (Ángyán et al., 2012; Wilson et al., 2017; Tretyachenko et al., 2017), согласно которой высокий уровень внутренней неупорядоченности новых белков снижает их способность к агрегации, уменьшая тем самым их потенциальный вред для клетки. Это дает возможность преадаптироваться новым белкам и кодирующих их генам в популяции, до того, как они зафиксируются в ней окончательно. Однако в исследованиях, проведенных на дрожжах *S. cerevisiae* (Vakirlis et al., 2018) и мышах (Schmitz Bornberg-Bauer,

2018) показано, что высокая внутренняя неупорядоченность белков, кодируемых генами, возникшими *de novo*, сопоставима с белками консервативных генов. Тем не менее, в GC-богатых районах реже встречаются стоп-кодоны и сигналы полиаденилирования (AATAAA), что также может способствовать возникновению генов *de novo* (Casola, 2018; Heames et al., 2020). У человека GC-богатые районы более транскрипционно активны (Lercher et al., 2003), а сайты связывания транскрипционных факторов часто обогащены GC-основаниями (Wang et al., 2012). В работе Касола (Casola, 2018) показано, что у домовой мыши только 20 из 152 генов, возникших *de novo*, кодируют белки с высокой внутренней неупорядоченностью за счет оверпринтинга (частичного использования одной из альтернативных ОРС более древнего гена). В работе Доулинга (Dowling et al., 2020) показано, что для человека характерен повышенный, не меняющийся в ходе эволюции приматов, уровень внутренней неупорядоченности белков, кодируемых новыми генами, которые перекрываются с GC-богатыми альтернативными ОРС более древних генов. Следует отметить, что частое формирование перекрытий генов, возникших *de novo*, с другими генами описано во многих работах у приматов и грызунов (Knowles, McLysaght, 2009; Murphy, McLysaght, 2012; Neme, Tautz 2013; Ruiz-Orera et al., 2015; McLysaght, Guerzoni, 2015; Xie et al., 2019), и по оценке Касола может быть почти в шесть раз более частым, чем формирование перекрывающихся пар среди более древних генов (Casola, 2018). Ряд других работ показывает, что белки, кодируемые генами *de novo*, не отличаются от более древних по способности к агрегации, у них не обнаруживают признаки преадаптации, и фиксирование в популяции происходит скорее стохастически, а не под действием отбора (Casola, 2018; Dowling et al., 2020). В работе Нелли-Тибо и Ландри (Nielly-Thibault, Landry, 2019) показано, что высокая внутренняя неупорядоченность новых белков не является следствием действия отбора в сторону снижения их способности к агрегации, это происходит в результате нейтральных процессов возникновения и фиксации в популяции новых генов. Таким образом, вопрос, является ли высокая внутренняя неупорядоченность белков, кодируемых *de novo*-генами, их общей характеристикой, до сих пор остается дискуссионным. Тем не менее внутренняя неупорядоченность новых белков отражает склонность к возникновению кодирующих их генов в GC-богатых транскрипционно-активных участках и вероятно зависит от специфики генома исследуемого организма и алгоритмов поиска новых генов.

Районы генов, возникших *de novo*, имеют характерные модификации хроматина. Анализ генов, возникших *de novo*, у растения *Arabidopsis thaliana* показал, что они часто обладают высоким уровнем метилирования ДНК и почти лишены модификаций гистонов (Li et al., 2016). Авторы также отмечают, что паттерн метилирования генов, возникших *de novo*, стабильно наследуется, а уровень их метилирования может быть опосредован наличием большого числа сайтов, соответствующих малым интерферирующим РНК длиной 24 нуклеотида, играющих ключевую роль в РНК-опосредованном метилировании ДНК. Предполагается, что низкий уровень экспрессии генов, возникших *de novo*, опосредованный высоким уровнем метилирования, позволяет им распространяться и фиксироваться в популяции. Исследования, проведенные на дрожжах, демонстрируют, что большинство генов, возникших *de novo*, локализуется в “горячих” точках рекомбинации, которые обычно лишены нуклеосом (Vakirlis et al., 2018). В исследовании, проведенном на нематоде *Pristionchus pacificus* показано, что точки старта транскрипции эволюционно новых генов часто имеют эпигенетические характеристики энхансеров, а не промотеров, как у консервативных генов (Werner et al., 2018).

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНОВ, ВОЗНИКШИХ *DE NOVO*

Оценка числа генов, возникших *de novo*, зависит от нескольких параметров. Она может определяться методом поиска (филостратиграфия, анализ синтенных регионов или более сложные комбинированные методы), зависеть от самого понятия “ген, возникший *de novo*” (например, из анализа могут быть исключены гены, перекрывающиеся с более консервативными генами или имеющие относительно сложную экзон-интронную структуру), доступности секвенированных геномов и транскриптомов видов аутгрупп, включения в анализ экспериментальных подтверждений функций исследуемых генов. Разнообразие условий и методологических подходов приводит к разным оценкам численности генов, возникших *de novo*, даже у одних и тех же организмов. Например, у *Drosophila melanogaster* в разных исследованиях обнаружено 5 (Levine et al., 2006), 2 (Zhou et al., 2008), 16 (Chen et al., 2010), 248 (Zhao et al., 2014), 66 (Heames et al., 2020) генов, возникших *de novo*; у домовой мыши обнаружено 69 (Murphy, McLysaght, 2012), 773 (Neme, Tautz, 2013), 152 (Casola, 2018) таких гена; у человека – 3 (Knowles, McLysaght, 2009) и 66 (Wu et al., 2011). Следует отметить, что значительная часть генов, обнаруженных в одном исследовании, часто не подтверждается в других, так как авторы используют разные по чувствительности методы поиска отдаленных гомологов. Но даже используя наиболее жесткие параметры поиска гомологичных последовательностей большинство авторов едины во мнении, что, не смотря на высокую степень дивергенции, не позволяющую обнаружить эволюционные гомологи исследуемой последовательности (Vakirlis et al., 2020), процесс возникновения генов *de novo* действительно существует.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОВ *DE NOVO*

Возникновение генов *de novo* в эволюции может происходить в соответствии с несколькими моделями, которые не являются взаимоисключающими.

Транскрипция предшествует возникновению ОРС. Согласно этой модели, начальным этапом появления гена *de novo* является стабильная, но малоинтенсивная транскрипция некодирующего участка генома (Schlötterer, 2015). В пользу этой модели говорят данные исследований, в которых показано, что большая часть генома, не несущая аннотированных генов эукариот способна транскрибироваться, что приводит к возникновению пула длинных некодирующих РНК (нкРНК), значительная часть которых связывается с рибосомами (Kapranov et al., 2007; Wilson, Masel, 2011; Clark et al., 2011; Ruiz-Orera et al., 2014) и вероятно транслируется в виде коротких пептидов (Ruiz-Orera et al., 2014; Ingolia et al., 2014). В процессе эволюции мутации в генах длинных нкРНК могут приводить к удлинению коротких открытых рамок считывания, которые в дальнейшем поддерживаются отбором. Также возможно, что гены нкРНК уже несут относительно длинные рамки считывания, которые прерываются стоп-кодонами. В этом случае мутации, затрагивающие стоп-кодоны могут привести к возникновению полноразмерной рамки считывания (Schlötterer, 2015). Существует ряд исследований, проведенных на разных группах организмов, в которых показано, что возникновению новой ОРС и ее трансляции предшествовала активная транскрипция этого региона (Cai et al., 2008; Carvunis et al., 2012; Reinhardt et al., 2013; Zhang et al., 2019; Schmitz et al., 2020). Особую роль в возникновении генов *de novo* могут играть двунаправленные промоторы и энхансеры (Wu, Sharp 2013; Majic, Payne, 2020). Так, показано, что в районе энхансеров часто транскрибируются так называемые энхансерные РНК (De Santa et al., 2010; Kim et al., 2010; Notani, Rosenfeld, 2016; Haberle, Stark, 2018), которые предположительно могут создавать положительную обратную связь, стимулирующую их собственную транскрипцию, что в конечном итоге приведет к возникновению нового гена (Wu, Sharp, 2013). Так, если эти энхансерные РНК несут даже короткие ОРС, то их относительно высокий уровень экспрессии (возникающий благодаря положительной обратной связи) может способствовать взаимодействиям с рибосомой и возможной трансляции. Но, так как энхансеры активны только в определенных типах клеток (He et al., 2014), трансляция энхансерных РНК будет ограничена только ими, что может способствовать действию отбора в направлении стабилизации экспрессии “полезных” новых белков и возникновению новых генов (Wilson, Masel, 2011). Способность энхансеров в ходе эволюции трансформироваться в промоторы (Carelli et al., 2018) также будет способствовать стабилизации экспрессии нового гена, если он будет обладать адаптивными преимуществами. Таким образом энхансеры могут способствовать как возникновению генов *de novo*, создавая геномное окружение, благоприятствующее транскрипции, так и включению новых генов в существующие генные сети (Majic, Payne, 2020).

ОРС первична по отношению к транскрипции. В данной модели предполагается, что в геноме есть множество неактивных ОРС и для начала их транскрипции и трансляции необходимо возникновение рядом регуляторного элемента (например, промотора) (Schlötterer, 2015). В пользу этой модели говорят результаты исследований, в которых показано, что в геномах эукариот находится множество предсказанных ОРС достаточно длинных для того, чтобы кодировать функционально-значимые пептиды (Carvunis et al., 2012; Zhao et al., 2014). Анализ 248 полиморфно-экспрессирующихся генов, возникших *de novo* у *Drosophila melanogaster*, позволяет предположить, что они возникли из межгенных нетранскрибируемых ОРС (Zhao et al., 2014). Ген тресковых рыб *AFGP*, кодирующий гликопротеин-антифриз, является примером возникновения гена на основе полностью сформировавшейся ОРС, которая стала транскрибироваться после ее предполагаемой транслокации в район, содержащий промотор (Zhuang et al., 2019). Следует отметить, что как минимум у конститутивно экспрессирующихся генов дрожжей большая часть информации о регуляции транскрипцией мРНК закодирована в ОРС, а не в промоторах (Espinar et al., 2018), на основании чего можно предположить, что ОРС генов, возникших *de novo*, могли сочетать в себе информацию о белке и о регуляции собственной транскрипцией, а их промоторы возникали позже. Можно предположить, что энхансеры или переходные от энхансеров к промоторам регуляторные элементы в этом случае тоже играют роль активаторов транскрипции “молчащих” рамок считывания, поскольку энхансеры способны регулировать экспрессию многих дистанционно-удаленных районов генома.

Возникновение генов de novo из прото-генов. Эта модель основана на предположении, что в геноме существуют множество транскрибируемых и транслируемых рамок считывания, лежащих в межгенных участках (Carvunis et al., 2012). Такие ОРС могут стать так называемыми “прото-генами”, способствующими адаптации организма путем реализации генетической информации, которая обычно скрыта в межгенных участках. Некоторые из прото-генов иногда могут сохраняться в ходе эволюции и становится генами *de novo*, если их экспрессия дает адаптивные преимущества организму. В отличие от псевдогенов, прото-гены не обнаруживают гомологии к известным генам, возникают из негенных последовательностей и обладают промежуточными характеристиками (уровень экспрессии, кодирующий потенциал ОРС, длина, паттерн модификации хроматина, возможность белок-белковых и межгенных взаимодействий и др.) между генами и некодирующими участками. Таким образом формируется континуум между некодирующими участками генома, прото-генами и генами. Модель возникновения генов *de novo* за счет прото-генов хорошо подтверждается результатами исследований на арабидопсисе (Li et al., 2016), дрожжах (Carvunis et al., 2012; Abrusán, 2013) и дрозофиле (Heames et al., 2020).

Гипотеза возникновения генов de novo "Out of testis" ("Из семенника"). Независимо от того, как возникают гены *de novo*, предполагается, что основным регионом их экспрессии у животных являются семенники. В ряде исследований, проведенных на дрозофиле и позвоночных, самый высокий уровень экспрессии генов, возникших *de novo*, отмечается в семенниках (Levine et al., 2006; Begun et al., 2006, 2007; Zhao et al., 2014; Wu et al., 2011; Villanueva-Cañas et al., 2017; Neme, Tautz, 2016). Результаты этих исследований в совокупности с данными о высокой скорости эволюции генов, связанных с размножением (Swanson, Vacquier, 2002; Clark et al., 2006) привели к возникновению гипотезы "Out of testis" ("Из семенника") о решающей роли полового отбора в возникновении генов *de novo*. Было высказано предположение о том, что семенник-специфичные гены, возникшие *de novo*, по неизвестным причинам предпочтительнее сохраняются в ходе эволюции (Palmieri et al., 2014). Предполагается, что высокая транскрипционная активность в семенниках млекопитающих, возникающая за счет высокой экспрессии белков, ее осуществляющих (Schmidt, 1996) и большого количества открытого хроматина (Kleene, 2001), а также иммунная привилегированность семенников, создают необходимые условия для возникновения генов *de novo* (Kaessmann, 2010; Oss, Carvunis, 2019; Zhang, Zhou, 2019).

ПРОБЛЕМА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНОВ, ВОЗНИКШИХ *DE NOVO*

Даже проследив эволюционный путь определенной последовательности, приводящий к возникновению нового гена, одной из проблем при поиске генов, возникших *de novo*, является отсутствие общепринятой точки зрения на то, какой момент времени на филогенетическом древе можно считать моментом возникновения гена. Одной из причин этого является отсутствие единого мнения о том должен ли ген формироваться в полностью некодирующем участке генома (Oss, Carvunis, 2019). Другая проблема, затрудняющая анализ генов, возникших *de novo*, состоит в том, что исследуемая последовательность предполагаемого гена должна соответствовать понятию "ген". Общепринято, что настоящий ген должен кодировать функциональный продукт: белок, или РНК (в случае РНК-генов). Однако, существуют разные взгляды на то, что определяет функцию гена, отчасти в зависимости от того, оценивается ли данная последовательность с позиций генетических, биохимических или эволюционных подходов (Doolittle et al., 2014; Kellis et al., 2014; McLysaght, Hurst, 2016).

Считается, что истинные гены, возникшие *de novo*, должны экспрессировать продукт (на уровне белка или РНК) (Schlötterer, 2015), создавая таким образом предпосылки для воздействия на них естественного отбора. Экспрессия на уровне белка и/или РНК, возникшая *de novo* внутри последовательности ДНК, является важным критерием для придания ей статуса "ген". Экспрессия отдельных генов на уровне РНК может быть подтверждена как давно используемыми стандартными методами (ПЦР с обратной транскрипцией, ПЦР в реальном времени, нозерн-блоттинг, анализ РНК, основанный на ее защите с помощью комплементарной РНК от действия РНКаз), так и более современными широкомасштабными техниками (секвенирование РНК-библиотек). Оценить экспрессию на уровне белка можно, использовав стандартные методики (вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия), или широкомасштабные (рибосомный профайлинг) (Ingolia et al., 2009). При этом достоверным экспериментальным подтверждением возникновения гена *de novo* является отсутствие экспрессии синтенного района у видов аутгруппы (Andersson et al., 2015).

Наличие экспрессии в исследуемом районе ДНК, конечно, не является единственным критерием для выяснения функциональности предполагаемого гена, возникшего *de novo*. Более значимыми в этом случае являются результаты генетических экспериментов, таких как нокаут (совокупность методик, позволяющих полностью "выключить" ген) и нокдаун (совокупность методик, позволяющих искусственно снизить экспрессию конкретного гена), так как на основе них можно проследить фенотипические изменения в ответ на нарушение экспрессии исследуемого района (Kellis et al., 2014). Так, для гена *QQS* у *Arabidopsis thaliana* в результате нокдауна с помощью РНК-интерференции было продемонстрировано его участие в метаболизме крахмала (нокдаун *QQS* приводил к повышенному содержанию крахмала в листьях в конце световой фазы) (Li et al., 2009); в работе Чена и соавт. (Chen et al., 2010) показано, что нокдаун возникших *de novo* генов *Drosophila melanogaster CG9284*, *CG31882* и *CG30395* приводит к летальности. Тем не менее, в случае масштабных биоинформационных скринингов геномов подобные эксперименты обычно не проводятся, но для оценки функциональной значимости предполагаемых генов, возникших *de novo*, в целях получения предварительной информации удобно использовать дополнительные скрининги белок-белковых и межгенных взаимодействий. Для скрининга белок-белковых взаимодействий могут использованы, например, такие методы, как дрожжевой дигибридный скрининг и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI-TOF). Оценка генетических взаимодействий исследуемого гена может быть проведена с помощью базы данных BioGRID (Stark et al., 2011). Так, используя данные MALDI-TOF/TOF для белка, кодируемого возникшим *de novo* геном *MDF1* у дрожжей *S. cerevisiae* было предсказано, а в дальнейшем доказано методом коиммунопреципитации, его взаимодействие с белком Snf1p, которое в дальнейшем приводит к ускорению метаболизма глюкозы (Li et al., 2014). В работе Абрусан, также проведенной на дрожжах *S. cerevisiae,* с помощью баз данных BioGRID по белок-белковым, генетическим и регуляторным взаимодействиям (YEASTRACT, Abdulrehman et al., 2011), и в работе по оценке вовлеченности разных групп генов в межгенные взаимодействия (Costanzo et al., 2010), показано, что новые гены слабее интегрированы в регуляторные генные сети, чем более древние (Abrusán, 2013).

Кроме того, для доказательства функциональной значимости исследуемого локуса можно использовать эволюционные подходы, оценивающие действие отбора. В случае таксон-специфичных белок-кодирующих генов одним из признаков действия на них отбора является отношение числа несинонимичных к числу синонимичных замен нуклеотидов (Ka/Ks, dN/dS), вычисленное в ходе анализа геномов разных видов данного таксона. Это отношение показывает находится ли исследуемый локус под действием нейтрального (=1), отрицательного (<1) или положительного (>1) отбора. Также в случае видоспецифичных белок-кодирующих генов отношение числа несинонимичных к числу синонимичных замен нуклеотидов pN/pS можно вычислить на основе данных о полиморфизме в разных линиях или популяциях исследуемых видов. С учетом того, что видоспецифичные гены, возникшие *de novo*, по определению не обладают высокой консервативностью, оценка таких признаков может быть затруднена без анализа большого числа секвенированных геномов линий или популяций. Примером этому могут служить три гена домовой мыши *Mus musculus* (*ENSMUSG00000054057 – Udng1*, *ENSMUSG00000053181 – Udng2*, *ENSMUSG00000078518 – Udng3*), возникшие *de novo*, которые имеют доказанные функции в организме (*Udng1* участвует в регуляции поведения и роста костей, *Udng2* участвует в регуляции поведения, *Udng3* участвует в регуляции времени появления второго помета), но не проявляют признаков действия на них отбора (Xie et al., 2019). Поэтому для выявления действия отбора используют другие характеристики: дивергенцию нуклеотидов в синтенных районах, консервативность границ открытых рамок считывания и их кодирующий потенциал, определяемый на основе частоты встречаемости гексамеров нуклеотидов (Ruiz-Orera et al., 2015).

Несмотря на сложности, связанные с выяснением функции генов, возникших *de novo*, накапливается все больше данных, подтверждающих их роль в жизненно важных и патологических процессах. Например, имеются сведения, что специфические для человека гены вовлечены в онкологические процессы. На модели мышей было показано, что ген *NYCM*, который является уникальным для человека и шимпанзе, регулирует патогенез нейробластом (Chen et al., 2013). Другой специфический для приматов ген *PART1*, синтезирующий длинную некодирующую РНК (lncRNA), в одних работах идентифицирован как опухолевый супрессор, в других – как онкоген (Toll-Riera et al., 2009; Lin et al., 2000; Kang et al., 2018). Несколько других генов, возникших *de novo*, специфичных для человека или приматов, например, *PBOV1* (Samusik et al., 2013), *GR6* (Guerzoni, McLysaght, 2016), *MYEOV* (Papamichos et al., 2015), *ELFN1-AS1* (Kozlov, 2016), и *CLLU1* (Knowles, McLysaght, 2009) также связаны с раком. Специфическая экспрессия многих новых генов в человеческом мозге позволяет высказывать смелые предположения о том, что такие гены могут влиять на когнитивные способности человека (Wu et al., 2011). Одним из таких примеров является уже упомянутый ген *FLJ33706*, который демонстрирует повышенную экспрессию в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (Li et al., 2010). В принципе, экспрессия специфичных для приматов генов в мозге эмбриона человека выше по сравнению с экспрессией подобных генов в мозге мыши. (Zhang et al., 2011). Большинство этих генов, некоторые из которых возникли *de novo*, экспрессируются в неокортексе, который, как известно, отвечает за формирование многих когнитивных способностей человека. Кроме того, они обнаруживают признаки положительного отбора и зачастую участвуют в регуляции транскрипции (Zhang et al., 2011). Помимо своей роли в процессах канцерогенеза, имеются сведения, что возникшие *de novo* гены млекопитающих связаны с работой иммунной системы (Toll-Riera et al., 2009; Villanueva-Cañas et al., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение отметим, что возникшие *de novo* гены важны не только с точки зрения эволюционной биологии – были высказаны предположения, что новые гены, включая те, которые сформировались *de novo*, могут играть важную роль в накоплении специфичных видовых признаков и особенностей (Tautz, Domazet-Lošo, 2011; McLysaght, Guerzoni, 2015; Chen et al., 2013). Сложность заключается в том, что у многих видоспецифических генов отсутствуют аннотированные функции (Villanueva-Cañas et al., 2017). Тем не менее, накопленные данные о преимущественной экспрессии генов *de novo* в семенниках (см. выше), указывающие на их роль в репродукции, вместе с данными о функциях новых генов и их связи с различными заболеваниями у человека и жизненно важными процессами у разных групп организмов говорят в пользу предположения об их роли в накоплении специфичных для каждого вида признаков. Поскольку в настоящее время функции многих, возникших *de novo*, генов человека (и других организмов) остаются не полностью охарактеризованными, необходимы работы, направленные на оценку их конкретного вклада в здоровье и развитие.

ГЛОССАРИЙ

Аутгруппа – филогенетически удаленная от исследуемой группы сестринских таксонов группа, происходящая от общего предка, служит в качестве точки сравнения для исследуемой группы таксонов.

нкРНК – не кодирующая РНК

Ортологи – гомологичные, то есть имеющие общее эволюционное происхождение, схожую структуру, и выполняющие схожую функцию, гены у разных видов организмов.

ОРС – Открытая Рамка Считывания – участок гена, кодирующий белок.

Синтения – нахождение генетических локусов на одной и той же хромосоме, вне зависимости от того, являются ли они сцепленными по данным анализа на сцепленное наследование.

Синтенные блоки – консервативные участки сравниваемых геномов, в которых сохраняется порядок расположения исследуемых элементов.

Скрытые модели Маркова – статистические модели, которые используют для распознавания генов, моделирования их структуры, моделирования семейств последовательностей и др.

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – программное обеспечение, позволяющее находить области сходства между последовательностями белков или нуклеотидов.

CS-BLAST (Context-Specific BLAST) – программное обеспечение расширяющее чувствительность BLAST по поиску схожих аминокислотных последовательностей.

PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) – программное обеспечение, расширяющее возможности BLAST по поиску схожих аминокислотных последовательностей, позволяет пользователю находить сильно филогенетически удаленные гомологичные белки.

k-меры – часть последовательности нуклеотидов определенной длины k.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00272а) и в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 года № 0088-2021-0007 “Молекулярно-генетические механизмы регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Р.О. Черезов проводил анализ мировой литературы и написание основного текста статьи. Автор Ю.Е. Воронцова участвовала в редактировании и обсуждении текста статьи. О.Б. Симонова инициировала написание обзора и редактировала текст.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Abdulrehman D., Monteiro P.T., Teixeira M.C. et al. YEASTRACT: providing a programmatic access to curated transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae* through a web services interface // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. D136–D140.

Abrusán G. Integration of new genes into cellular networks, and their structural maturation // Genetics. 2013. V. 195. № 4. P. 1407–1417.

Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.

Andersson D.I., Jerlström-Hultqvist J., Näsvall J. Evolution of new functions *de novo* and from preexisting genes // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7. № 6. P. a017996.

Ángyán A.F., Perczel A., Gáspári Z. Estimating intrinsic structural preferences of de novo emerging random-sequence proteins: is aggregation the main bottleneck? // FEBS Lett. 2012. V. 586. № 16. P. 2468–2472.

Basile W., Sachenkova O., Light S. et al. High GC content causes orphan proteins to be intrinsically disordered // PLoS Comp. Biol. 2017. V. 13. № 3. P. e1005375.

Begun D.J., Lindfors H.A., Kern A.D. et al. Evidence for *de novo* evolution of testis-expressed genes in the *Drosophila yakuba/Drosophila erecta* Clade // Genetics. 2007. V. 176. P. 1131–1137.

Begun D.J., Lindfors H.A., Thompson M.E. et al. Recently evolved genes identified from *Drosophila yakuba* and *D. erecta* accessory gland expressed sequence tags // Genetics. 2006. V. 172. P. 1675–1681.

Bekpen C., Xie C., Tautz D. Dealing with the adaptive immune system during *de novo* evolution of genes from intergenic sequences // BMC Evol. Biol. 2018. V. 18.

Bitard-Feildel T., Heberlein M., Bornberg-Bauer E. et al. Detection of orphan domains in *Drosophila* using “hydrophobic cluster analysis” // Biochimie. 2015. V. 119. P. 244–253.

Cai J., Zhao R., Jiang H. et al. De novo origination of a new protein-coding gene in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2008. V. 179. № 1. P. 487–496.

Carelli F.N., Liechti A., Halbert J. et al. Repurposing of promoters and enhancers during mammalian evolution // Nature Comm. 2018. V. 9. № 1. P. 4066.

Carvunis A.-R., Rolland T., Wapinski I. et al. Proto-genes and *de novo* gene birth // Nature. 2012. V. 487. P. 370–374.

Casola C. From *de novo* to “*de nono*”: The majority of novel protein-coding genes identified with phylostratigraphy are old genes or recent duplicates // Genome Biol. Evol. 2018. V. 10. № 11. P. 2906–2918.

Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J. et al. The genetic landscape of a cell // Science. 2010. V. 327. № 5964. P. 425–431.

Chen S., Krinsky B.H., Long M. New genes as drivers of phenotypic evolution // Nat. Rev. Genet. 2013. V. 14. № 9. P. 645–660.

Chen S., Zhang Y.E., Long M. New genes in *Drosophila* quickly become essential // Science. 2010. V. 330. P. 1682–1685.

Clark M.B., Amaral P.P., Schlesinger F.J. et al. The reality of pervasive transcription // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 7. P. e1000625.

Clark N.L., Aagaard J.E., Swanson W.J. Evolution of reproductive proteins from animals and plants // Reproduction. 2006. V. 131. № 1. P. 11–22.

De Santa F., Barozzi I., Mietton F. et al. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers // PLoS Biology. 2010. V. 8. № 5. P. e1000384.

Domazet-Loso T., Brajković J., Tautz D. A phylostratigraphy approach to uncover the genomic history of major adaptations in metazoan lineages // Trends Genet. 2007. V. 23. № 11. P. 533–539.

Domazet-Lošo T., Tautz D. A phylogenetically based transcriptome age index mirrors ontogenetic divergence patterns // Nature. 2010. V. 468. № 7325. P. 815–818.

Donoghue M.T., Keshavaiah C., Swamidatta S.H. et al. Evolutionary origins of *Brassicaceae* specific genes in *Arabidopsis thaliana* // BMC Evol. Biol. 2011. V. 11. № 1. P. 47.

Doolittle W.F., Brunet T.D.P., Linquist S. et al. Distinguishing between “function” and “effect” in genome biology // Genome Biol. Evol. 2014. V. 6. № 5. P. 1234–1237.

Dowling D., Schmitz J.F., Bornberg-Bauer E. Stochastic gain and loss of novel transcribed open reading frames in the human lineage // Genome Biol. Evol. 2020. V. 12. № 11. P. 2183–2195.

Dujon B. The yeast genome project: what did we learn? // Trends Genet. 1996. V. 12. № 7. P. 263–270.

Ekman D., Elofsson A. Identifying and quantifying orphan protein sequences in fungi // J. Mol. Biol. 2010. V. 396. № 2. P. 396–405.

Elhaik E., Sabath N., Graur D. The “inverse relationship between evolutionary rate and age of mammalian genes” is an artifact of increased genetic distance with rate of evolution and time of divergence // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. № 1. P. 1–3.

Espinar L., Tamarit M.À.S., Domingo J., Carey L.B. Promoter architecture determines cotranslational regulation of mRNA // Genome Res. 2018. V. 28. № 4. P. 509–518.

Gehrmann T., Reinders M.J.T. Proteny: discovering and visualizing statistically significant syntenic clusters at the proteome level // Bioinformatics. 2015. V. 31. № 21. P. 3437–3444.

Ghiurcuta C.G., Moret B.M.E. Evaluating synteny for improved comparative studies // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 12. P. i9–i18.

Grasse P.-P. Evolution of Living Organisms. London: Academic Press, 1977. 308 p.

Guerzoni D., McLysaght A. De novo genes arise at a slow but steady rate along the primate lineage and have been subject to incomplete lineage sorting // Genome Biol. Evol. 2016. V. 8. № 4. P. 1222–1232.

Guo W.-J., Li P., Ling J. et al. Significant comparative characteristics between orphan and nonorphan genes in the rice (*Oryza sativa* L.) genome // Comp. Func. Genomics. 2007. V. 2007. P. 21676.

Haberle V., Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation // Nat. Rev. Mol. 2018. V. 19. № 10. P. 621–637.

Haldane J.B.S. The part played by recurrent mutation in evolution // Am. Nat. 1933. V. 67. № 708. P. 5–19.

He B., Chen C., Teng L. et al. Global view of enhancer-promoter interactome in human cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 21. P. E2191–E2199.

Heames B., Schmitz J., Bornberg-Bauer E. A Continuum of evolving *de novo* genes drives protein-coding novelty in *Drosophila* // J. Mol. Evol. 2020. V. 88. № 4. P. 382–398.

Heinen T.J.A.J., Staubach F., Häming D. et al. Emergence of a new gene from an intergenic region // Curr. Biol. 2009. V. 19. № 18. P. 1527–1531.

Husnik F., McCutcheon J.P. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes // Nat. Rev. Microbiol. 2018. V. 16. № 2. P. 67–79.

Ingolia N.T., Brar G.A., Stern-Ginossar N. et al. Ribosome profiling reveals pervasive translation outside of annotated protein-coding genes // Cell Rep. 2014. V. 8. № 5. P. 1365–1379.

Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R.S. et al. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling // Science. 2009. V. 324. № 5924. P. 218–223.

Jacob F. Evolution and tinkering // Science. 1977. V. 196. P. 1161–1166.

Kaessmann H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes // Genome Res. 2010. V. 20. № 10. P. 1313–1326.

Kang M., Ren M., Li Y., Fu Y. et al. Exosome-mediated transfer of lncRNA PART1 induces gefitinib resistance in esophageal squamous cell carcinoma via functioning as a competing endogenous RNA // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2018. V. 37.

Kapranov P., Willingham A.T., Gingeras T.R. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. № 6. P. 413–423.

Kellis M., Wold B., Snyder M.P. et al. Defining functional DNA elements in the human genome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 17. P. 6131–6138.

Kim T.-K., Hemberg M., Gray J.M. et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers // Nature. 2010. V. 465. P. 182–187.

Knowles D.G., McLysaght A. Recent *de novo* origin of human protein-coding genes // Genome Res. 2009. V. 19. № 10. P. 1752–1759.

Kozlov A.P. Expression of evolutionarily novel genes in tumors // Infect. Agents Cancer. 2016. V. 11. № 34.

Kröger H., Donner I., Skiello G. Influence of a new virostatic compound on the induction of enzymes in rat liver // Arzneimittelforschung. 1975. V. 25. № 9. P. 1426–1429.

Lercher M.J., Urrutia A.O., Pavlíček A. et al. A unification of mosaic structures in the human genome // Hum. Mol. Genet. 2003. V. 12. № 19. P. 2411–2415.

Levine M.T., Jones C.D., Kern A.D. et al. Novel genes derived from noncoding DNA in *Drosophila melanogaster* are frequently X-linked and exhibit testis-biased expression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 26. P. 9935–9939.

Li C.-Y., Zhang Y., Wang Z. et al. A human-specific *de novo* protein-coding gene associated with human brain functions // PLoS Comput. Biol. 2010. V. 6. № 3. P. e1000734.

Li D., Dong Y., Jiang Y. et al. A *de novo* originated gene depresses budding yeast mating pathway and is repressed by the protein encoded by its antisense strand // Cell Res. 2010. V. 20. № 4. P. 408–420.

Li D., Yan Z., Lu L. et al. Pleiotropy of the *de novo*-originated gene MDF1 // Sci. Rep. 2014. V. 4. № 1. P. 7280.

Li L., Foster C.M., Gan Q. et al. Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in *Arabidopsis* leaves // Plant J. 2009. V. 58. № 3. P. 485–498.

Li W., Notani D., Rosenfeld M.G. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. № 4. P. 207–223.

Li Z.-W., Chen X., Wu Q. et al. On the origin of *de novo* genes in *Arabidopsis thaliana* populations // Genome Biol. Evol. 2016. V. 8. № 7. P. 2190–2202.

Lin B., White J.T., Ferguson C. et al. PART-1: a novel human prostate-specific, androgen-regulated gene that maps to chromosome 5q12 // Cancer Res. 2000. V. 60(4). P. 858–863.

Liu D., Hunt M., Tsai I.J. Inferring synteny between genome assemblies: a systematic evaluation // BMC Bioinformatics. 2018. V. 19. № 1. P. 26.

Luis Villanueva-Cañas J., Ruiz-Orera J., Agea M.I. et al. New genes and functional innovation in Mammals // Genome Biol. Evol. 2017. V. 9. № 7. P. 1886–1900.

Majic P., Payne J.L. Enhancers facilitate the birth of *de novo* genes and gene integration into regulatory networks // Mol. Biol. Evol. 2020. V. 37. № 4. P. 1165–1178.

McLysaght A., Guerzoni D. New genes from non-coding sequence: the role of *de novo* protein-coding genes in eukaryotic evolutionary innovation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1678. P. 20140332.

McLysaght A., Hurst L.D. Open questions in the study of *de novo* genes: what, how and why // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. № 9. P. 567–578.

Moyers B.A., Zhang J. Phylostratigraphic bias creates spurious patterns of genome evolution // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. № 1. P. 258–267.

Moyers B.A., Zhang J. Evaluating phylostratigraphic evidence for widespread *de novo* gene birth in genome evolution // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 5. P. 1245–1256.

Mukherjee S., Panda A., Ghosh T.C. Elucidating evolutionary features and functional implications of orphan genes in *Leishmania major* // Infect. Genet. Evol. 2015. V. 32. P. 330–337.

Muller H.J. The origination of chromatin deficiencies as minute deletions subject to insertion elsewhere // Genetica. 1935. V. 17. № 3. P. 237–252.

Murphy D.N., McLysaght A. De novo origin of protein-coding genes in murine rodents // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. P. e48650.

Neme R., Tautz D. Phylogenetic patterns of emergence of new genes support a model of frequent *de novo* evolution // BMC Genomics. 2013. V. 14. № 1. P. 117.

Neme R., Tautz D. Fast turnover of genome transcription across evolutionary time exposes entire non-coding DNA to *de novo* gene emergence // eLife. 2016. V. 5. P. e09977.

Nielly-Thibault L., Landry C.R. Differences between the raw material and the products of *de novo* gene birth can result from mutational biases // Genetics. 2019. V. 212. № 4. P. 1353–1366.

Nishida H. Detection and characterization of fungal-specific proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. № 11. P. 2646–2652.

Ohno S. Birth of a unique enzyme from an alternative reading frame of the preexisted, internally repetitious coding sequence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 8. P. 2421–2425.

Ohno S., Wolf U., Atkin N.B. Evolution from fish to mammals by gene duplication // Hereditas. 1968. V. 59. № 1. P. 169–187.

Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 160 p.

Oss S.B.V., Carvunis A.-R. De novo gene birth // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 5. P. e1008160.

Palmieri N., Kosiol C., Schlötterer C. The life cycle of *Drosophila* orphan genes // eLife. 2014. V. 3. P. e01311.

Papamichos S.I., Margaritis D., Kotsianidis I. Adaptive evolution coupled with retrotransposon exaptation allowed for the generation of a human-protein-specific coding gene that promotes cancer cell proliferation and metastasis in both haematological malignancies and solid tumours: the extraordinary case of MYEOV gene // Sci. 2015. V. 2015. P. 984706.

Pertea M., Shumate A., Pertea G. et al. Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise // bioRxiv. 2018. P. 332825.

Potter S.C., Luciani A., Eddy S.R. et al. HMMER web server: 2018 update // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. W200–W204.

Rancurel C., Khosravi M., Dunker A.K. et al. Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into *de novo* protein creation // J. Virol. 2009. V. 83. P. 10719–10736.

Ranz J.M., Casals F., Ruiz A. How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila* // Genome Res. 2001. V. 11. P. 230–239.

Reinhardt J.A., Wanjiru B.M., Brant A.T. et al. De novo ORFs in *Drosophila* are important to organismal fitness and evolved rapidly from previously non-coding sequences // PLoS Genet. 2013. V. 9. P. e1003860.

Ruiz-Orera J., Hernandez-Rodriguez J., Chiva C. et al. Origins of *de novo* genes in human and chimpanzee // PLoS Genet. 2015. V. 11. P. e1005721.

Ruiz-Orera J., Messeguer X., Subirana J.A. et al. Long non-coding RNAs as a source of new peptides // eLife. 2014. V. 3. P. e03523.

Samusik N., Krukovskaya L., Meln I., Shilov E., Kozlov A.P. PBOV1 is a human de novo gene with tumor-specific expression that is associated with a positive clinical outcome of cancer // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. P. e56162.

Schlötterer C. Genes from scratch – the evolutionary fate of *de novo* genes // Trends Genet. 2015. V. 31. № 4. P. 215–219.

Schmidt E.E. Transcriptional promiscuity in testes // Curr. Biol. 1996. V. 6(7). P. 768–769.

Schmitz J.F., Chain F.J.J., Bornberg-Bauer E. Evolution of novel genes in three-spanned stickleback populations // Heredity. 2020. V. 125. P. 50–59.

Schmitz J.F., Ullrich K.K., Bornberg-Bauer E. Incipient *de novo* genes can evolve from frozen accidents that escaped rapid transcript turnover // Nat. Ecol. Evol. 2018. V. 2. № 10. P. 1626–1632.

Stark C., Breitkreutz B.-J., Chatr-aryamontri A. et al. The BioGRID Interaction Database: 2011 update // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. D698–D704.

Swanson W.J., Vacquier V.D. The rapid evolution of reproductive proteins // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. № 2. P. 137–144.

Tautz D., Domazet-Lošo T. The evolutionary origin of orphan genes // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 10. P. 692–702.

Toll-Riera M., Bosch N., Bellora N. et al. Origin of primate orphan genes: a comparative genomics approach // Mol. Biol. Evol. 2009. V. 26. № 3. P. 603–612.

Tretyachenko V., Vymětal J., Bednárová L. et al. Random protein sequences can form defined secondary structures and are well-tolerated *in vivo* // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 15449.

Vakirlis N., Carvunis A.-R., McLysaght A. Synteny-based analyses indicate that sequence divergence is not the main source of orphan genes // eLife. 2020. V. 9. P. e53500.

Vakirlis N., Hebert A.S., Opulente D.A. et al. Molecular portrait of *de novo* genes in yeasts // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 3. P. 631–645.

Wang J., Zhuang J., Iyer S. et al. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors // Genome Res. 2012. V. 22. № 9. P. 1798–1812.

Weisman C.M., Murray A.W., Eddy S.R. Many, but not all, lineage-specific genes can be explained by homology detection failure // PLoS Biol. 2020. V. 18. № 11. P. e3000862.

Werner M.S., Sieriebriennikov B., Prabh N. et al. Young genes have distinct gene structure, epigenetic profiles, and transcriptional regulation // Genome Res. 2018. V. 28. № 11. P. 1675–1687.

Wilson B.A., Foy S.G., Neme R. et al. Young genes are highly disordered as predicted by the preadaptation hypothesis of de novo gene birth // Nat. Ecol. Evol. 2017. V. 1. № 6. P. 0146.

Wilson B.A., Masel J. Putatively noncoding transcripts show extensive association with ribosomes // Genome Biol. Evol. 2011. V. 3. P. 1245–1252.

Wu D.-D., Irwin D.M., Zhang Y.-P. De novo origin of human protein-coding genes // PLoS Genet. 2011. V. 7. № 11. P. e1002379.

Wu X., Sharp P.A. Divergent transcription: a driving force for new gene origination? // Cell. 2013. V. 155. № 5. P. 990–996.

Xie C., Bekpen C., Künzel S. et al. Studying the dawn of *de novo* gene emergence in mice reveals fast integration of new genes into functional networks // bioRxiv. 2019. P. 510214.

Zhang J.-Y., Zhou Q. On the regulatory evolution of new genes throughout their life history // Mol. Biol. Evol. 2019. V. 36. № 1. P. 15–27.

Zhang L., Ren Y., Yang T. et al. Rapid evolution of protein diversity by *de novo* origination in *Oryza* // Nat. Ecol. 2019. V. 3. № 4. P. 679–690.

Zhang W., Gao Y., Long M., Shen B. Origination and evolution of orphan genes and *de novo* genes in the genome of

Caenorhabditis elegans // Sci. China Life Sci. 2019. V. 62. P. 579–593.

Zhang Y.E., Landback P., Vibranovski M.D., Long M. Accelerated recruitment of new brain development genes into the human genome // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 10. P. e1001179.

Zhao L., Saelao P., Jones C.D. et al. Origin and spread of *de novo* genes in *Drosophila melanogaster* populations // Science. 2014. V. 343. № 6172. P. 769–772.

Zhou Q., Zhang G., Zhang Y. et al. On the origin of new genes in *Drosophila* // Gen. Res. 2008. V. 18. № 9. P. 1446–1455.

Zhuang X., Yang C., Murphy K.R. et al. Molecular mechanism and history of non-sense to sense evolution of antifreeze glycoprotein gene in northern gadids // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. № 10. P. 4400–4405.

The Phenomenon of *De Novo* Gene Birth and Evolution

R. O. Cherezov[1], Ju. E. Vorontsova[1], and O. B. Simonova[1, *]

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

**e-mail: osimonova@hotmail.com*

Evolutionary biologists have always been interested in the origin and evolution of new genes. The most obvious mechanisms of their formation are various kinds of chromosomal and intergenic rearrangements, implying the use of already existing genes as a starting material. The possibility of *de novo* origin of a functional gene within noncoding DNA was not fully rejected, but until recently, it was practically going to zero. Nevertheless, in 1996, after analyzing the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the first experimental evidence was obtained for the possibility of *de novo* gene birth. Ten years later, genes without homologues, presumably arose *de novo*, were found in *Drosophila*. The relatively high probability of genes arisen *de novo*, assessed in bioinformatics studies, has raised interest in this topic and made the search for them relevant. Now the number of works devoted to the problem of *de novo* gene birth in different organisms, including humans, is constantly growing, demystifying this phenomenon. Nevertheless, many questions still require theoretical and practical research. This review is devoted to problems of finding and characterizing genes that have arisen *de novo* and the proposed mechanisms of their birth.

Keywords: gene, evolution, *de novo*

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 453–466

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО ФОНА НА ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРОВ К ПОЛОВЫМ ГОРМОНАМ И МИГРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ И СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ *IN VITRO*

© 2021 г. Л. Ш. Измайлова[a, *], А. А. Гайдамака[a], О. О. Сербина[a], Е. А. Воротеляк[a]

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

**e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru*

Поступила в редакцию 25.06.2021 г.
После доработки 22.07.2021 г.
Принята к публикации 27.07.2021 г.

Подготовка к имплантации эмбриона – это комплексный процесс, включающий в себя изменения как на клеточном, так и на тканевом уровнях в эпителии и строме эндометрия матки. От регуляции преимплантационных изменений эндометрия и наступления периода рецептивности зависит успешность прохождения беременности. Моделирование регуляции функционирования эндометрия *in vitro* позволяет изучить процесс подготовки эндометрия к имплантации эмбриона, что особенно важно для разработки терапевтических подходов для лечения заболеваний, ассоциированных с бесплодием. В работе показано влияние стероидных половых гормонов на изменение полярности эпителия эндометрия *in vitro*, что также является немаловажным процессом во время имплантации *in vivo*. Также описано взаимное влияние эстрогена и прогестерона как основных регуляторов функционирования эндометрия на экспрессию их рецепторов.

Ключевые слова: эндометрий, эпителий, строма, эпителио-мезенхимный переход, половые стероидные гормоны

DOI: 10.31857/S0475145021060069

ВВЕДЕНИЕ

Внутренняя оболочка матки, эндометрий, поддерживает имплантацию и дальнейшее развитие эмбриона. Основные клеточные популяции эндометрия представлены клетками люминального и железистого эпителия и подлежащей стромы. В ходе приобретения рецептивности эндометрий проходит серию последовательных изменений. Процесс преобразования эндометрия перед имплантацией у человека и мыши управляется двумя основными гормонами: эстрогеном (E2) и прогестероном (P4), которые активируют соответствующие сигнальные пути (Wang, Dey, 2006).

Нарушение процесса имплантации у человека является причиной более чем половины случаев потери беременности на ранних сроках (Wilcox et al., 1988). В связи с этим молекулярная регуляция имплантации активно изучается.

Изучение имплантации эмбриона человека в матке по техническим и этическим причинам затруднено, поэтому исследования в этой области проводятся с использованием модельных животных. Одним из распространенных модельных объектов является мышь (*Mus musculus*). Помимо решения проблем, возникающих при репродукции, модели имплантации эмбрионов *in vitro* необходимы для исследования раннего постимплантационного развития. Этот этап мало изучен, так как прикрепившийся эмбрион развивается внутри матки, что затрудняет наблюдение и манипуляции с ним. Для решения этой проблемы использование мыши в качестве модельного объекта в системах *in vitro* является перспективным направлением. Например, в одной из последних работ было показано развитие эмбриона мыши *in vitro* от стадии гаструляции до позднего органогенеза (Aguilera-Castrejon et al., 2021). Также для мыши была показана имплантация эмбриона *in vitro* с последующим развитием зародышевого цилиндра (Bedzhov et al., 2014). Работа с мышью помогает избежать этических вопросов при исследовании как имплантации эмбриона и его развития, так и функционирования эндометрия во время беременности. Модели с использованием клеток эпителия и стромы, выделенных из эндометрия мыши, позволяют реконструировать имплантацию *in vitro*.

Подготовка к имплантации у мыши начинается с секреции преовуляторного E2 фолликулярными клетками яичников. Функция E2 обеспечивается путем его взаимодействия с ядерными рецепторами ERα (Estrogen Receptor α) и ERβ (Estrogen Receptor β). ERα является доминирующей формой рецепторов к E2 в матке мыши, поскольку она отвечает за подготовку эндометрия к имплантации (Vasquez and DeMayo, 2013). На 1–2 сутки беременности E2 запускает пролиферацию эпителия, связываясь с ERα стромы (Vasquez and DeMayo, 2013). В строме включается экспрессия инсулин-подобного фактора роста-1 (Insulin-like growth factor 1; IGF-1) и белков семейства факторов роста фибробластов (Fibroblast growth factors; FGFs), которые паракринно действуют на эпителиальные клетки и активируют пролиферацию (Hantak et al., 2014). Кроме того, фолликулярный E2 обеспечивает подготовку клеток стромы к децидуализации и активирует экспрессию рецепторов к P4 (Progesterone receptors; PRs) в эндометрии. Также были получены данные, не согласующиеся с приведенными выше результатами. Тан с соавторами показали, что в первый день беременности ER экспрессируется только в эпителии, но не в строме (Tan et al., 1999). Однако, эти данные были получены методом FISH с детекцией при помощи метода авторадиографии, что затрудняет однозначную трактовку полученных результатов. К 4 суткам, когда желтое тело уже сформировано, наблюдается небольшой пик E2, который участвует в активации эмбриона и подготовке стромы к децидуальной реакции (Zhang et al., 2013). Растущий на 3 сутки беременности уровень P4 вызывает в эндометрии изменения, необходимые для поддержания развития прикрепившегося эмбриона. P4 действует через ядерные рецепторы – PRs. Они также имеют 2 изоформы: PRA и PRB, которые транскрибируются под разными промоторами с одного гена (Vasquez and DeMayo, 2013). P4 подавляет экспрессию ERα в эндометрии, пролиферацию эпителиальных клеток и, наоборот, активирует пролиферацию клеток стромы, которая связана с децидуальной реакцией (Zhang et al., 2013). В дополнение к этому, P4 вызывает ремоделирование эпителиального барьера, которое необходимо для облегчения прикрепления и инвазии эмбриона (Ye, 2020). Исходя и этих данных, можно заключить, что баланс эстроген-зависимых и прогестерон-зависимых эффектов во многом обуславливает успешное прохождение имплантации.

Несмотря на то, что существует немало работ в этой области, до сих пор не выяснено, каким образом половые стероидные гормоны влияют на экспрессию их рецепторов в эпителиальном и стромальном компартментах эндометрия во время беременности. Также не ясно, вносит ли взаимодействие клеточных популяций эпителия и стромы какой-либо вклад в изменение экспрессии рецепторов к половым гормонам. Например, для мыши было показано, что PR экспрессируется в ЛЭ в околоимплантационные сроки, уровень его экспрессии снижается с началом децидуализации стромы. При этом, показано, что сигнальный путь, индуцируемый P4 через PR необходим для прохождения имплантации. На этапе, когда полностью сформирована децидуальная зона, экспрессия PR в эпителии уже не детектируется. В то же время у псевдобеременных мышей снижение уровня экспрессии PR в эпителии происходит только если искусственно индуцирована децидуальная реакция. Таким образом, прекращение экспрессии PR в эпителии эндометрия регулируется локальными факторами, продуцируемыми в матке, и регулируется за счет диалога между стромальным и эпителиальным компартментами (Honglu et al., 2012).

Для создания адекватной модели эндометрия необходимо понимание изменений, происходящих в ответ на гормональную стимуляцию в нативных клетках эпителия и стромы. Регуляция экспрессии рецепторов к половым гормонам в течение эстрального цикла и беременности, а также роли взаимодействия эпителия и стромы требует отдельного изучения. Также исследования в этой области помогут расширить знания о регуляции эндометрия *in vivo*.

Люминальный эпителий (ЛЭ) эндометрия является первым барьером на пути инвазии эмбриона. Эпителий в ходе имплантации претерпевает трансформацию цитоплазматической мембраны (ТЦМ), которая характеризуется изменением поляризации клеток. Этот процесс начинается перед инвазией бластоцисты и, вероятно, необходим для облегчения прохождения эмбриона сквозь эпителиальный барьер. Во многом ТЦМ сходна с эпителио-мезенхимным переходом (ЭМП), свойственным опухолевым клеткам.

Ряд авторов высказали предположение, что в околоимплантационный период ЛЭ проходит именно ЭМП и приобретает способность к миграции. Эта гипотеза была проверена на линии клеток аденокарциномы эндометрия (Ishikawa – Ишикава). Ишикава – это клеточная линия, используемая в качестве модели рецептивного эпителия эндометрия. В работе Учиды с соавторами (Uchida et al., 2012) показали, что культивирование клеток эпителия эндометрия в среде с E2 и P4 вызывает повышение миграторного потенциала клеток, перестройку актинового цитоскелета с образованием стресс-фибрилл актина и повышение уровня экспрессии виментина. Также в эпителиальных клетках как при обработке гормонами, так и при добавлении сфероидов из клеток хориокарциномы человека (JAR-cells) происходило характерное для ЭМП “кадгериновое переключение”: снижение уровня экспрессии E-кадгерина и повышение уровня экспрессии N-кадгерина. Монослойная культура клеток Ишикава поддерживала прикрепление сфероидов *in vitro*, при этом площадь разрастания сфероидов была больше, если клетки предварительно культивировали в среде с E2 и P4.

Авторы предложили модель, согласно которой клетки ЛЭ приобретают способность к миграции и перемещаются по направлению от зоны имплантации, тем самым облегчая прохождение эмбриона сквозь эпителиальный барьер (Uchida et al., 2012). Однако этот результат получен с использованием опухолевых клеток.

Целью данной работы было проверить гипотезу о прохождении клетками эпителия ЭМП *in vitro* и внести ясность в вопрос о влиянии половых стероидов на уровень экспрессии их рецепторов в клетках эпителия и стромы матки мыши *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В работе были использованы самки мыши линии Balb/C в возрасте 8–12 недель. Животные содержались в стандартных условиях вивария ИБР РАН по 4–6 особей в клетке, со свободным доступом к корму и воде. В каждом эксперименте было задействовано по 6 особей, которые до начала эксперимента содержались в одной клетке. Все манипуляции с животными были одобрены этической комиссией ИБР РАН (Протокол № 40 от 17.09.2021).

Для получения культур клеток эпителия и стромы матки самок мыши стимулировали E2 для синхронизации в фазе эструса по стандартному протоколу (De Clercq et al., 2017).

Получение культур клеток эпителия и стромы матки

Для получения культур клеток животных выводили из эксперимента при помощи цервикальной дислокации и изолировали матки. Рога маток промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% раствора гентамицина и разрезали продольно. Из ткани маток всех животных, участвовавших в эксперименте, выделяли тотальные фракции клеток эпителия и стромы, которые затем распределялись по группам в зависимости от времени культивирования и типа гормонального воздействия. Для выделения эпителия ткань рогов матки помещали в 0.1% раствор диспазы при 4°С на 12 ч. На следующий день ткань в растворе диспазы (Gibco, Ирландия) инкубировали при 37°С в течение 15 мин с последующим интенсивным встряхиванием на вортексе в течение 2 мин. Среду с отделившимися эпителиальными пластами отбирали и центрифугировали. Эпителий промывали полной средой ДМЕМ, осаждали центрифугированием. Для выделения стромы оставшуюся после выделения эпителия ткань матки гомогенизировали и помещали в 0.2% раствор коллагеназы первого типа (Gibco, Ирландия) на 5 ч при 37°С при постоянном перемешивании. Далее отбирали и центрифугировали раствор с клетками стромы эндометрия. Строму промывали полной средой ДМЕМ и осаждали центрифугированием. Осадок с клетками эпителия или стромы переносили в лунки 12–96 луночного планшета или чашки Петри.

Культивирование клеток эпителия и стромы эндометрия

Клетки эпителия и стромы культивировали в полной минимальной среде Игла ДМЕМ в инкубаторе в стандартных условиях – 37°С, 5% CO_2. Полная среда ДМЕМ состояла из среды ДМЕМ (Gibco, Ирландия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% Glutamax (Gibco, Ирландия), 1% PenStrep (Gibco, Ирландия). Для моделирования гормонального воздействия на эпителий и строму эндометрия, соответствующего имплантации, в среду добавляли гормоны, разведенные в диметилсульфоксиде (DMSO; SigmaAldrich, США) с конечной концентрацией E2 – 0.9 нМ и P4 – 63.5 нМ (SigmaAldrich, США). Конечная концентрация ДМСО (SigmaAldrich, США) в среде после добавления в нее гормонов не превышала 0.02%. Культивирование клеток проводили в 4-х гормональных режимах – контроль без добавления гормонов, с добавлением E2, с добавлением P4 и с обоими гормонами. Концентрации гормонов, соответствующие гормональному фону мыши в период имплантации, были подобраны по результатам анализа литературы (Ye et al., 2012). Смена сред проводилась каждые 1–2 дня.

Иммуноцитохимия

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки предварительно были посажены в лунки 48 луночного планшета. Фиксацию, отмывки и окраску первичными и вторичными антителами (табл. 1) проводили по стандартному протоколу (De Clercq et al., 2017). Клетки анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Япония). В качестве контроля использовали образцы клеток, окрашенных без добавления первых антител.

Проточная цитометрия

Клетки снимали с пластика стандартным способом (Kubaczka et al., 2014). Пробоподготовку для анализа клеток при помощи метода проточной цитофлуориметрии проводили стандартным способом (Shakya et al., 2020). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Attune NxT (ThermoFisher, США). В качестве контроля использовали образцы клеток, окрашенных без добавления первичных антител.

Таблица 1. Список антител, использованных в работе

Название	В каком животном изготовлено	Фирма, каталожный номер
I Polyclonal Anti-Vimentin antibody	Chicken	Abcam ab24525
I Monoclonal Anti-PanCytokeratin antibody	Mouse	Abcam ab7753
II Anti-Chicken Alexa-488 conjugated antibody	Goat	Thermo Fisher A11039
II Anti-Mouse Alexa-488 conjugated antibody	Goat	Thermo Fisher A32723

Определение времени удвоения культуры

Время удвоения культуры определяли на приборе xCELLigence (RTCA, США) стандартным способом (Hamidi et al., 2017).

ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени)

Из клеток эпителия, стромы эндометрия мыши или гомогената ткани матки мыши выделяли тотальную РНК с помощью Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, США) по инструкциям производителя. Затем синтезировали кДНК с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия) со случайными праймерами по инструкциям производителя. После этого проводили количественную ПЦР с детекцией в реальном времени с применением смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по инструкциям производителя на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). В качестве контроля в каждом повторе эксперимента для каждого праймера (табл. 2) были проанализированы пробы RT–, то есть пробы, в которые на этапе обратной транскрипции не была добавлена обратная транскриптаза. Данные пробы не содержали к-ДНК и их анализ методом ПЦР-РВ был показателем геномной ДНК в пробе. Полученные результаты были нормированы на экспрессию референсного гена *ActinB*, выбранного на основании обзора литературы (Lin et al., 2013).

Таблица 2. Праймеры, использованные при проведении ПЦР-РВ. Все праймеры были произведены фирмой Евроген, Россия

Название	Последовательность
moVim-F	GCCAGGCCAAGCAGGAGTCAAAC
moVim-R	ATCCTGCAGGCGGCCAATAGTGT
moCdh1-F	GCTGGACCGAGAGAGTTACC
moCdh1-R	CCGGGCATTGACCTCATTCT
moKrt8-F	AACAAGTTCGCCTCCTTCATT
moKrt8-R	CATGTTGTCCATGTTGCTCCTC
moPgr-F	CAATGGAAGGGCAGCATAACT
moPgr-R	ACACCGTCAAGGGTTCTCATA
moEsr1-F	AGGCTTTGGGGACTTGAATCT
moEsr1-R	CATGCGGAACCGACTTGAC
moActb-F	ACCCGCCACCAGTTCG
moActb-R	AGCATCGTCGCCCGC
moTbp-F	ACCGTGAATCTTGGCTGTAAA
moTbp-R	GTCTGGATTGTTCTTCACTCTTG
moCdh2-F	GCCCGGTTTCACTTGAGAG
moCdh2-R	GTACCGCAGCATTCCATTCA
moSnai2-F	GCCTCCAAGAAGCCCAACTA
moSnai2-R	GCCGACGATGTCCATACAGT
moTwist2-F	GGACCAAGGCTCTCAGAACAA
moTwist2-R	TCCAGGCTTCCTCGAAACAG

Модель раны и оценка уровня миграции клеток эпителия эндометрия

Клетки эпителия эндометрия культивировали при каждом гормональном режиме 2 сут до достижения 90% конфлюэнтности. Затем микропипеткой с пластиковым носиком удаляли клетки полосой в монослое, анализировали и фотографировали область раны. Через 24 ч после нанесения раны ее повторно фотографировали (рис. 1). Анализ зарастания раны производился описанным ранее методом (Uchida et al., 2012).

Статистические методы

Данные анализировали с помощью Microsoft Excel и программы GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, v.5, США). Для статистического анализа данных и построения графиков использовали программу GraphPad® Prism (GraphPad Software, v.5, США). Если распределение сравниваемых значений параметра в нескольких независимых выборках отличалось от нормального, то для статистической обработки результатов использовали непараметрический аналог ANOVA – ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Для распределений, не отличающихся от нормального, использовали дисперсионный анализ ANOVA. Проверку гипотезы о нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Статистически значимыми приняты данные со значением $P < 0.05$. Для попарного сравнения двух нормально распределенных зависимых выборок использовался парный

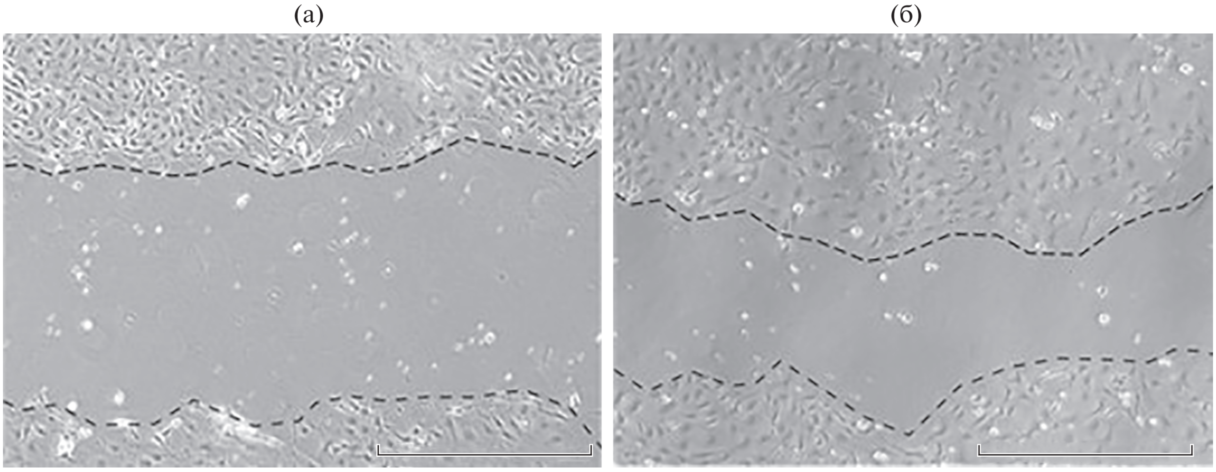


Рис. 1. Оценка клеточной подвижности. (а) – область раны сразу после ее нанесения; (б) – область раны через 24 часа после нанесения.

t-критерий Стьюдента. Для выборок, имеющих не нормальное распределение, использовали непараметрический аналог – критерий Уилкоксона. Для сравнения двух несвязанных выборок применялся t-критерий Стьюдента для независимых выборок и его непараметрический аналог – критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученных культур

Культуры эпителия и стромы выделяли из эндометрия матки мыши по разработанному нами протоколу: подобрали время и условия инкубирования с растворами ферментов (см. Материалы и методы), благодаря которым в рамках одного эксперимента возможно выделить из матки мыши и эпителий, и клетки стромы. Это позволяет использовать культуры клеток эпителия и стромы от одной группы животных, что повышает достоверность экспериментов.

Стромальные и эпителиальные клетки в культуре имели фибробластоподобную и эпителиальную морфологию, соответственно (рис. 2в, 2г). Клеточные культуры стромы и эпителия были окрашены на мезенхимальные (виментин) (рис. 2а, 2д) и эпителиальные (PanCK) (рис. 2б, 2е) маркеры и проанализированы при помощи методов иммуноцитохимии и проточной цитофлуориметрии.

Была проведена оценка экспрессии эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках эпителия и стромы при помощи метода ПЦР-РВ (рис. 3). В этом эксперименте в качестве эпителиальных маркеров использовали Е-кадгерин и специфический маркер эпителия эндометрия кератин 8. Для оценки уровня экспрессии стромальных маркеров использовали виментин.

Эти эксперименты подтвердили эпителиальную природу культуры эпителия эндометрия и мезенхимальную природу культуры клеток стромы эндометрия мыши, что демонстрирует эффективность протокола их выделения и чистоту полученных культур. Для дальнейшей характеризации выделенных культур клеток скорость их пролиферации была оценена при помощи прибора xCELLegence (RTCA). Среднее время удвоения популяции клеток эпителия составляло 100 ч и было достоверно выше, чем среднее время удвоения клеток культуры стромы эндометрия мыши (69 ч).

Уровень миграции клеток эпителия эндометрия при разных гормональных режимах культивирования

Для оценки влияния половых стероидных гормонов на способность к миграции эпителия эндометрия была исследована подвижность клеток на модели раны. Через 24 ч после нанесения царапины были обнаружены статистически значимые различия в изменении площади раны практически между всеми группами, кроме образцов, обработанных обоими гормонами (E2P4) и контролем (без обработки гормонами; Б/Г) (рис. 4). При этом степень закрытия раны была наибольшей в группе клеток, обработанных P4, что говорит о высокой клеточной подвижности. Самая низкая подвижность клеток была обнаружена в культуре, которая находилась в среде с E2. Уровень миграции в группе клеток, обработанных обоими гормонами, имел промежуточные значения.

В ходе анализа уровня миграции опухолевых клеток в модели раны было обнаружено достоверное повышение подвижности клеток при культивировании в среде с обоими гормонами (Uchida et al., 2012). Мы также наблюдали увели-

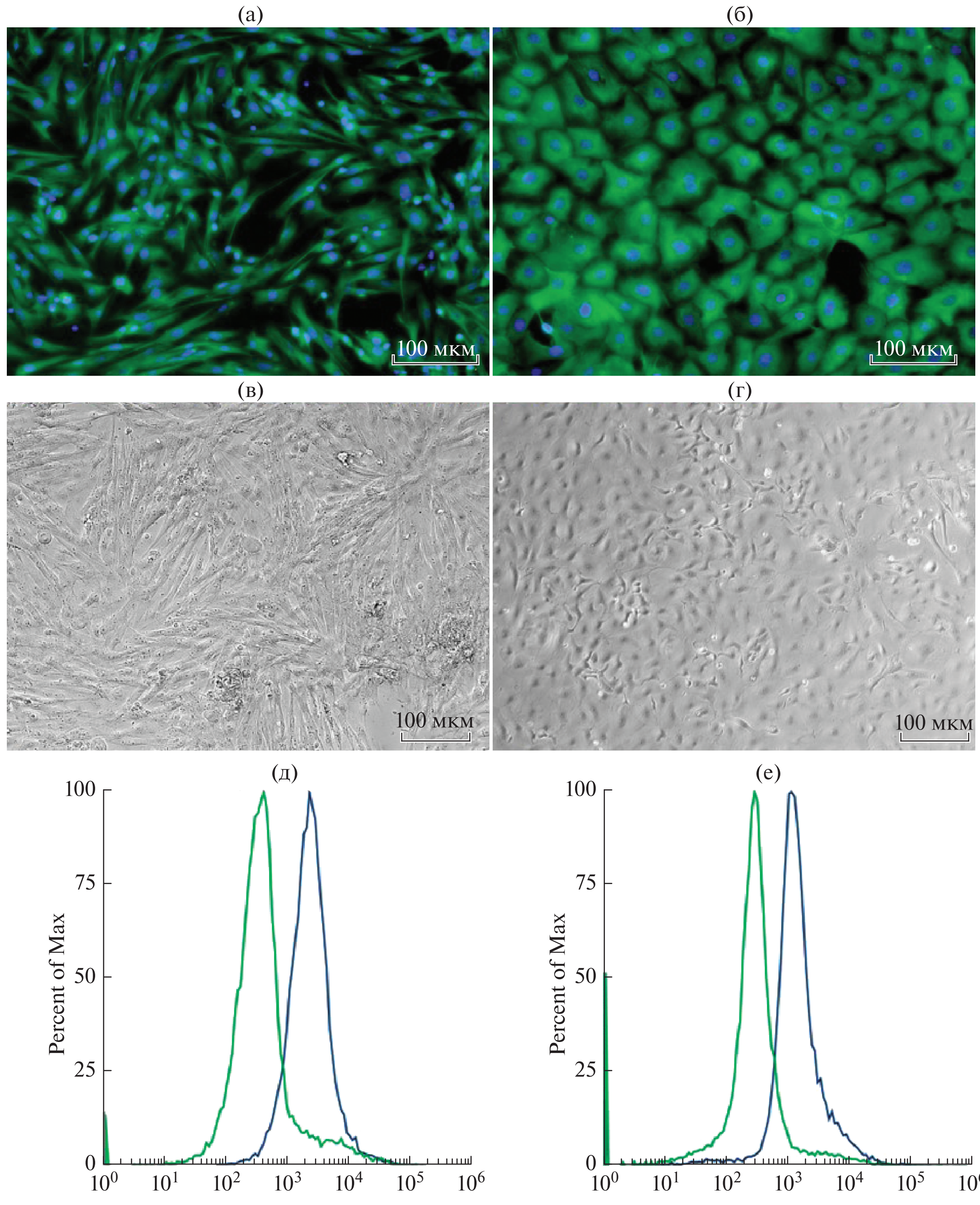


Рис. 2. Культуры клеток, выделенные из эндометрия мыши. Иммуноцитохимическая окраска клеток, (а) строма, окраска антителами к виментину и DAPI, (б) эпителий, окраска антителами к PanCK и DAPI. Общий вид культуры, фазовый контраст, (в) строма, (г) эпителий. Проточная цитометрия, (д) строма, окраска антителами к виментину, (е) эпителий, окраска антителами к PanCK. На графиках представлено сравнение интенсивности флуоресценции окрашенных образцов (синий) и контроля (зеленый).

чение уровня миграции клеток в условиях культивирования с E2P4, однако только относительно обработанных E2 клеток, но не контрольной группы. При этом наибольшая подвижность клеток обнаружена в культуре, обработанной P4, а наименьшая – в среде с E2. Исходя из полученных данных, мы пришли к выводу, что P4 активирует способность к миграции эпителия, а E2 – подавляет ее. Известно, что E2 оказывает эффект, поддерживающий полярность эпителия, и вос-

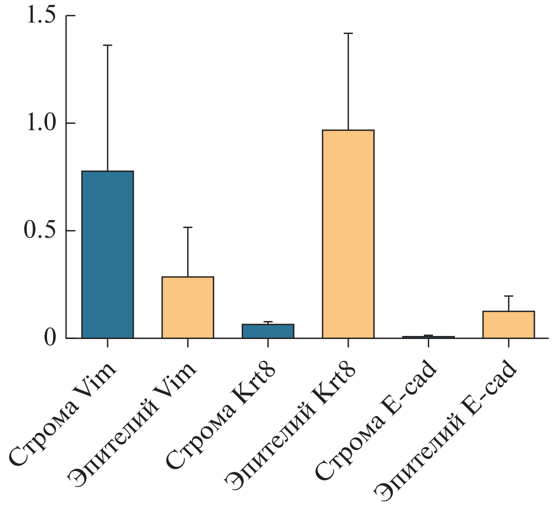


Рис. 3. Анализ экспрессии генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров в культурах клеток эпителия и стромы, выделенных из эндометрия матки. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

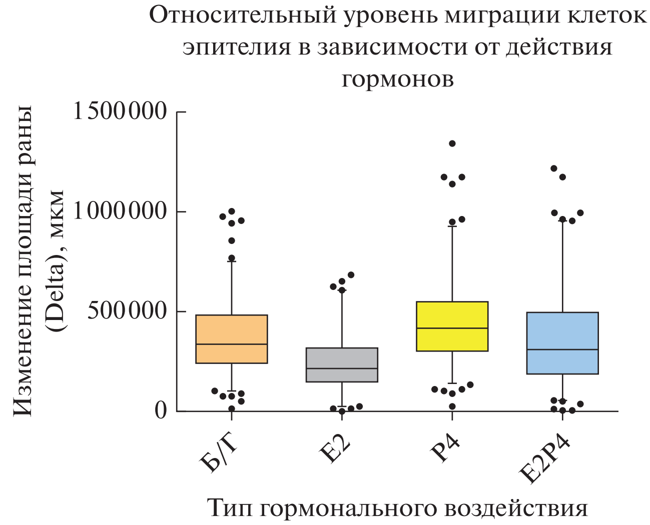


Рис. 4. График зависимости уровня миграции клеток эпителия эндометрия от типа гормонального воздействия. Статистически значимые различия обнаружены между всеми группами, кроме E2P4 и Б/Г (без обработки гормонами). P-значение ≤0.006.

станавливает микроворсинки на апикальной поверхности клеток (Quinn et al., 2019; Whitby et al., 2020). Следовательно, подавление миграции клеток эпителия эндометрия может быть связано с ингибирующим действием E2. Необходимо также подчеркнуть, что именно P4 является основным регулятором процесса имплантации. Кроме того, показана роль контролируемых P4 факторов в снижении апико-базальной полярности эпителия эндометрия (Zhang et al., 2013; Kallen et al., 2014). Этот результат согласуется с данными, полученными в более ранних исследованиях, и может частично подтверждать предположения о приобретении подвижности клетками люминального эпителия во время имплантации *in vivo* и ключевом влиянии P4 на этот процесс. Поэтому наша модель в контексте оценки подвижности клеток является релевантной и отражает некоторые гормон-зависимые эффекты, действующие в ходе имплантации.

Уровень экспрессии мезенхимальных, эпителиальных маркеров и генов-маркеров ЭМП в культуре эпителиальных клеток эндометрия при различных гормональных режимах культивирования

Для оценки влияния гормонов на изменение эпителиального фенотипа клеток эпителия эндометрия со временем культивирования был проведен ПЦР-РВ генов, кодирующих маркеры эпителия, мезенхимы и факторы транскрипции ЭМП. В качестве образцов для анализа экспрессии выбранных генов были использованы культуры эпителия эндометрия, которые находились в средах с гормонами в течение 2 и 5 сут.

На первом этапе была исследована экспрессия генов *Cdh1* и *Cdh2*, кодирующих E-кадгерин и N-кадгерин, соответственно (рис. 5). Экспрессия эпителиального маркера, *Cdh1*, достоверно уменьшалась в эпителии к 5 суткам культивирования ($p < 0.01$). В то же время экспрессия мезенхимного маркера, *Cdh2*, увеличивалась ($p < 0.01$). Однако уровень экспрессии этих генов не зависел от типа гормонального воздействия.

На втором этапе была изучена экспрессия следующей пары генов: *Krt8* и *Vim* (рис. 6). Эти гены также кодируют маркеры эпителия (кератин-8) и мезенхимы (виментин). В отличие от *Cdh1* экспрессия *Krt8* в целом не зависела от времени культивирования. При этом экспрессия *Vim* аналогично *Cdh2* достоверно увеличивалась на 5 сут культивирования ($p < 0.01$). Достоверных различий в экспрессии этих генов между типами гормональных режимов культивирования не наблюдалось.

Далее была проведена оценка уровней экспрессии генов *Twist2* и *Snai2*, кодирующих факторы транскрипции ЭМП (рис. 7). Их экспрессия также не зависела от типа гормонального воздействия, при этом уровень *Snai2* достоверно увеличивался к 5 дню культивирования ($p < 0.01$), а *Twist2* – практически не менялся со временем.

Процесс ТЦМ сходен с эпителио-мезенхимным переходом (ЭМП), свойственным опухолевым клеткам. Например, в ходе обоих процессов происходит разборка фокальных контактов, что способствует индивидуализации клеток (Lamouille et al., 2014; Kaneko et al., 2011, 2011). Также апикальная поверхность эпителиальных клеток

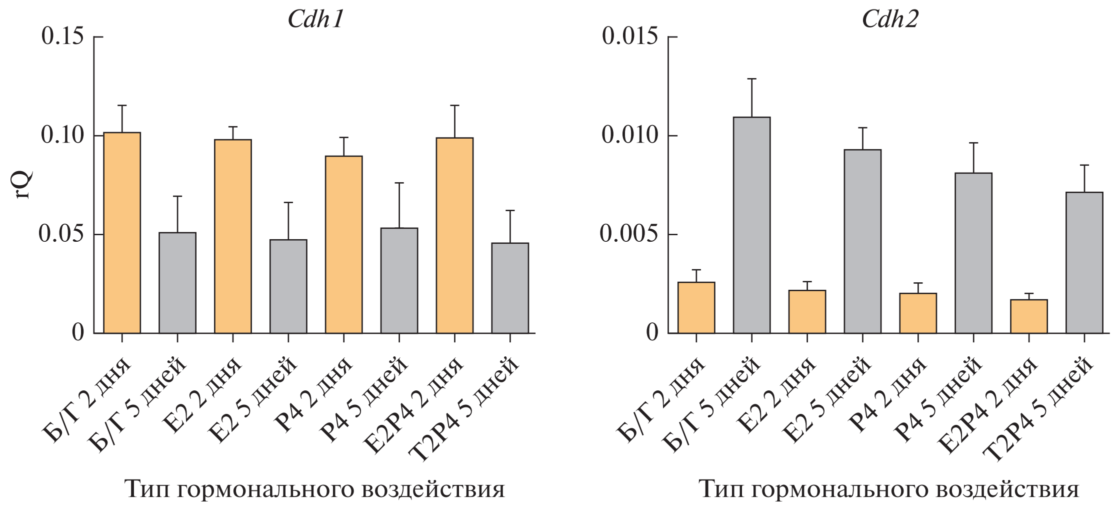


Рис. 5. Анализ экспрессии генов эпителиального (*Cdh1*) и мезенхимального (*Cdh2*) типов кадгеринов в культурах клеток эпителия, выделенных из эндометрия матки и культивируемых при разных гормональных режимах в течение 2 и 5 сут. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

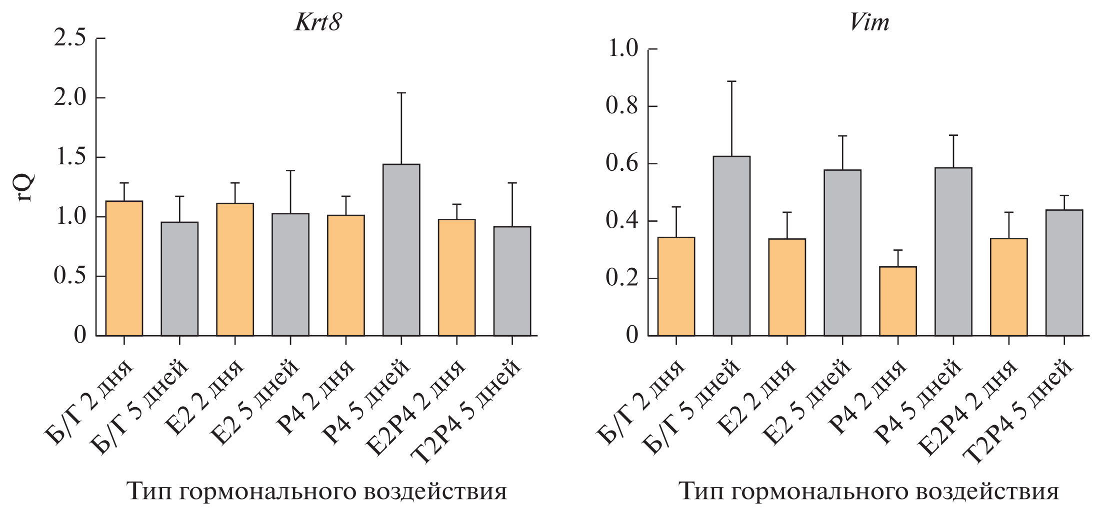


Рис. 6. Анализ экспрессии генов эпителиальных (*Krt8*) и мезенхимальных (*Vim*) маркеров в культурах клеток эпителия, выделенных из эндометрия матки и культивируемых при разных гормональных режимах в течение 2 и 5 сут. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

теряет микроворсинки (Chávez et al., 1985). В ремоделировании актинового цитоскелета как при ЭМП, так и при ТЦМ участвуют малые ГТФазы семейства RhoA, в дополнение к этому происходит диссоциация актина от белкового комплекса ERM (Ezrin, Radixin, Moesin), связывающего актин с белками цитоплазматической мембраны. Весомым аргументом в пользу гипотезы о ЭМП ЛЭ является результат, полученный в работах по анализу экспрессии генов, которые кодируют факторы транскрипции ЭМП. Экспрессия генов *Snai2* и *Twist2* увеличивается в эндометрии беременных мышей к моменту имплантации, при этом их белковые продукты при иммуногистохимическом окрашивании были преимущественно локализованы в эпителии эндометрия (Du et al., 2009; Gou et al., 2019).

Однако существует ряд отличий между ЭМП и ТЦМ. При ЭМП происходит разборка плотных контактов между клетками эпителия, что облегчает их миграцию. При подготовке к окну имплантации плотные соединения, наоборот, выявляются на латеральных мембранах клеток ЛЭ эндометрия, также присутствуют десмосомы, хотя и в меньшем количестве, чем до наступления рецептивности эпителия (Illingworth et al., 2000). В то же время при ЭМП белковые комплексы десмосом полностью разбираются для обеспечения

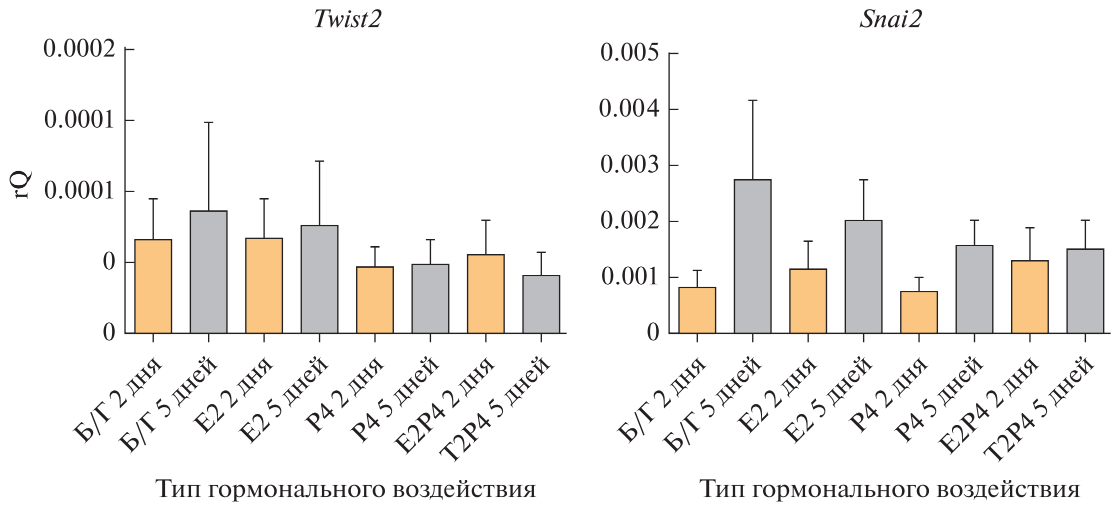


Рис. 7. Анализ экспрессии генов маркеров ЭМП (*Twist2*, *Snai2*) в культурах клеток эпителия, выделенных из эндометрия матки и культивируемых при разных гормональных режимах в течение 2 и 5 сут. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

миграции клеток (Whitby et al., 2020). На поверхности опухолевых клеток в процессе ЭМП образуются небольшие выпячивания цитоплазматической мембраны – блебы, а клетки эндометрия во время имплантации формируют пиноподии. Несмотря на то, что обе эти структуры – это богатые актином выступы на поверхности клеток, они имеют некоторые различия. Блебы участвуют в экзоцитозе везикул, несущих металлопротеиназы, тогда как на поверхности пиноподий происходит экзоцитоз LIF (Leukemia Inhibitory Factor), что способствует имплантации. Таким образом, природа процесса ТЦМ и его роль в имплантации не до конца выяснены.

Исходя из полученных нами результатов, можно заключить, что клетки эпителия в ходе культивирования могут претерпевать “кадгериновое переключение”, что свойственно для проходящих ЭМП клеток. При этом клетки не теряют эпителиальные свойства, что отражается в поддержании экспрессии *Krt8* на высоком уровне. Мы предполагаем, что эпителий в условиях 2D культуры может отчасти терять эпителиальный фенотип за счет измененной морфологии и поляризации клеток, перераспределения межклеточных соединений. Похожий результат был получен в 2D культуре клеток ретинального эпителия, который после первого пассажа приобретает черты мезенхимных клеток (Зурина, 2017; Tian et al., 2018). Вероятно, в условиях 2D культивирования эпителий эндометрия может проходить частичный ЭМП, при котором клетки могут приобретать мезенхимные маркеры без потери эпителиальных свойств (Nieto et al., 2016). Важно отметить, что влияние половых стероидных гормонов на изменение экспрессии генов-маркеров эпителия, мезенхимы и генов ЭМП не показано в нашей работе. Однако в исследовании на клетках аденокарциномы эндометрия человека были выявлены гормон-зависимые эффекты на культуру. Так, было выявлено, что клетки Ишикава в среде с обоими гормонами проходят “кадгериновое переключение”, формируют стресс-фибриллы актина, приобретают способность к миграции и начинают экспрессировать виментин (Uchida et al., 2012). Несмотря на то, что авторы работы приводят аналогии с процессами, происходящими перед инвазией, мы считаем, что поддержание клеток Ишикава в среде с эстрадиолом активирует ER-зависимый путь ЭМП, не связанный с имплантацией (Liu et al., 2016). Следовательно, клетки Ишикава могут реагировать на действие гормонов не как нативные клетки люминального эпителия эндометрия во время имплантации, а как опухолевые клетки эндометрия на стимулирующие ЭМП сигналы. Из этого можно заключить, что использование опухолевых клеток для исследования влияния гормонов на полярность эпителия эндометрия может привести к получению ложноположительного результата. Наша модель также имеет ограничения, так как условия культивирования могут нести преобладающий эффект на изменение поляризации клеток эпителия, чем гормональные воздействия. Для более точного изучения влияния половых гормонов на клетки эпителия эндометрия необходимо создание 3D систем культивирования, например, органоидов, где эпителиальные клетки сохраняют свою нативную морфологию в условиях, приближенных к *in vivo* (Luddi et al., 2020).

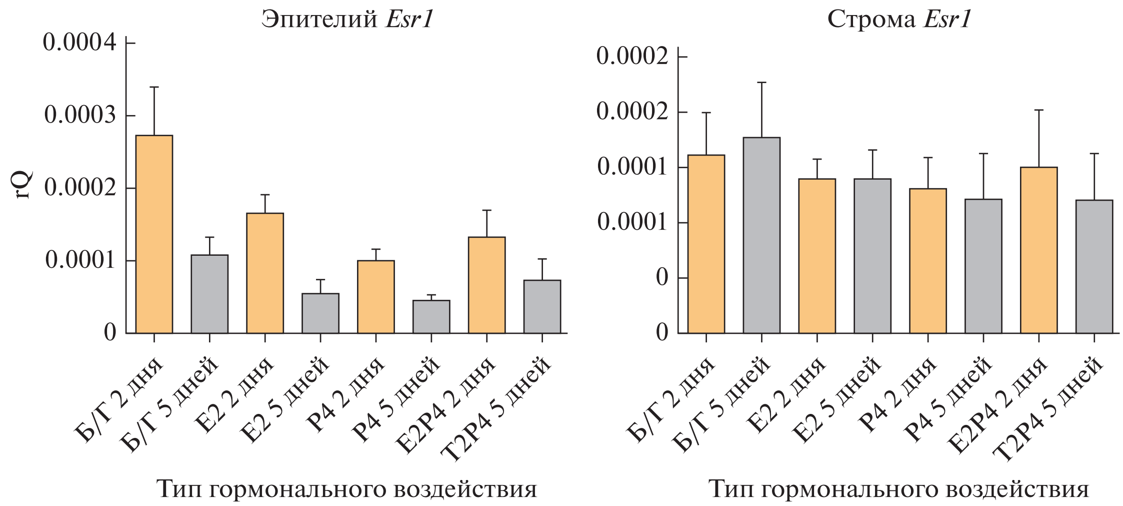


Рис. 8. Анализ экспрессии гена рецептора к эстрогену в культурах клеток эпителия и стромы, выделенных из эндометрия матки и культивируемых при разных гормональных режимах в течение 2 и 5 сут. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

Уровень экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону в культурах клеток эпителия и стромы эндометрия при различных гормональных режимах

Гормональная стимуляция мышей вызывала наступление фазы эструса, во время которой происходит оплодотворение и наступает беременность. Далее выделенные клетки содержались при гормональных режимах, в которых, помимо контрольной группы, клетки подвергались воздействию гормонов в концентрациях, соответствующих “окну имплантации” (Ye et al., 2012).

Уровень экспрессии *Esr1* в клетках эпителия эндометрия снижался во всех экспериментальных группах со временем культивирования. При этом, гормон-зависимые отличия между экспериментальными группами клеток эпителия были заметны только на второй день культивирования и практически полностью нивелировались к 5 дню. В литературе также описано снижение чувствительности эпителия эндометрия к гормонам в 2D культуре (Olalekan et al., 2017). Мы предполагаем, что полученный результат может быть связан с необходимостью совместного культивирования эпителиальных клеток со стромой, так как ответ на гормональную стимуляцию в эндометрии *in vivo* во многом определяется взаимодействиями стромального и эпителиального компартментов.

Р4 ингибировал экспрессию *Esr1* в клетках эпителия по сравнению с контролем уже на 2 сут культивирования ($p = 0.028$). Этот эффект сохранялся и к 5 сут ($p = 0.023$) (рис. 8). Наши результаты укладываются в концепцию того, что исходно высокий уровень *Esr1* в эпителии снижается за счет гормонального воздействия, обусловленного увеличением секреции Р4 перед имплантацией, что необходимо для снижения Е2-зависимой пролиферации и снижения полярности клеток люминального эпителия (Zhang et al., 2013). Также мы показали, что процесс Р4-зависимого ингибирования экспрессии ER не зависел от стромы и происходил в эпителии, культивируемом отдельно от стромальных клеток.

Экспрессия *Esr1* в строме не изменялась со временем культивирования, также не было выявлено гормон-зависимых эффектов (рис. 8). По имеющимся данным, в начале беременности уровень экспрессии ER возрастает на 3–4 день в подэпителиальном регионе стромы, что предполагает влияние эпителия на этот процесс. Дальнейшие изменения уровня экспрессии ER в строме происходят на 5–7 сут и связаны с образованием первичной и вторичной децидуальных зон (Tan et al., 1999). С этим согласуются полученные нами результаты: в отсутствие в культуральной системе эпителия и без моделирования децидуализации стромы уровень *Esr1* в ней закономерно не изменяется.

В работе, посвященной изучению зависимости экспрессии рецепторов к половым гормонам от стадий эстрального цикла, было показано, что интенсивность иммуногистохимической окраски ER была максимальной и в эпителии, и в строме во время диэструса и проэструса. Для этих стадий характерно высокое содержание Е2 в сыворотке крови (Mote et al., 2006). Мы не обнаружили прямой связи между воздействием Е2 и повышением уровня экспрессии *Esr1* в эпителии и строме. Однако стоит учитывать, что в этой работе уровень экспрессии рецепторов оценивали при помощи иммуногистохимических методов, которые не яв-

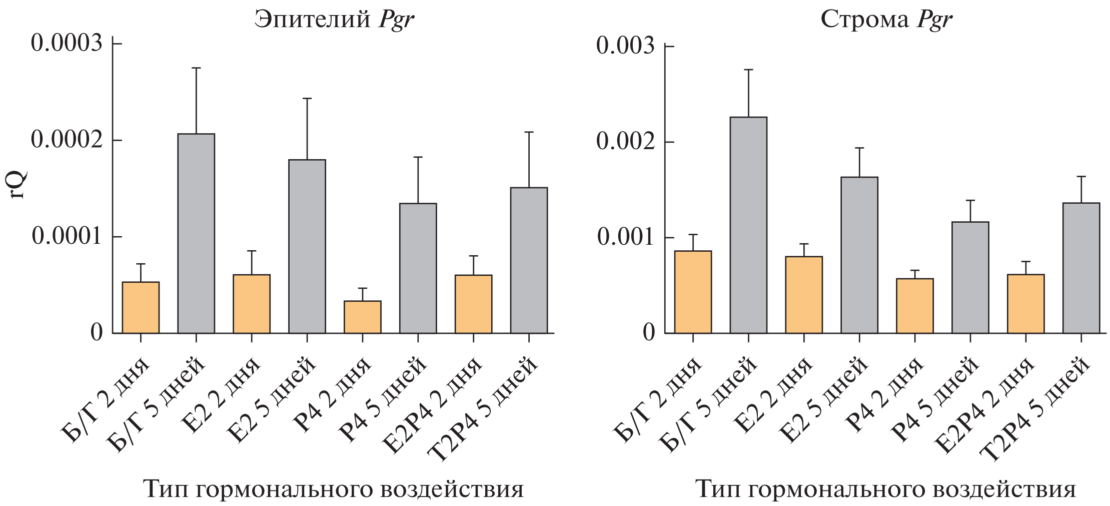


Рис. 9. Анализ экспрессии гена рецептора к прогестерону в культурах клеток эпителия и стромы, выделенных из эндометрия матки и культивируемых при разных гормональных режимах в течение 2 и 5 сут. Уровень экспрессии нормализован на экспрессию референсного гена *ActinB*.

ляются оптимальными для точной оценки уровня экспрессии ядерных рецепторов. Измерения проводили с интервалами 12–24 часа, эстральный цикл мыши нерегулярен и длится 4–5 дней, поэтому для измерения уровня экспрессии рецепторов желательны более короткие интервалы между измерениями.

В строме как на 2, так и на 5 сут, уровень экспрессии *Pgr* был значительно выше, чем в эпителии ($p < 0.05$). Это ожидаемый результат, так как строма эндометрия в большей степени является P4 зависимой тканью, чем эпителий.

И в эпителии, и в строме экспрессия *Pgr* имела схожую динамику. На 2 сут уровень экспрессии *Pgr* не изменялся вне зависимости от режима гормонального воздействия. На пятые сутки экспрессия *Pgr* возрастала, как в эпителии ($p < 0.01$), так и в строме ($p < 0.01$).

Для мыши было показано, что *Pgr* экспрессировался в ЛЭ в околоимплантационные сроки, уровень его экспрессии снижался с началом децидуализации стромы. При этом сигнальный путь, индуцируемый P4 через PR был необходим для прохождения имплантации. На этапе, когда децидуальная зона была сформирована, экспрессия PR в эпителии уже не детектировалась. В то же время у псевдобеременных мышей снижение уровня экспрессии PR в эпителии проходило только, если искусственно была индуцирована децидуальная реакция. Таким образом, прекращение экспрессии PR в эпителии эндометрия регулируется локальными факторами, продуцируемыми в матке, а также за счет молекулярного диалога между стромальным и эпителиальным компартментами (Honglu et al., 2012). Этот факт согласуется с нашими результатами: в изолированном в культуре и разобщенном с децидуализирующейся стромой ЛЭ не происходило снижение уровня экспрессии PR, которое *in vivo* обусловлено взаимодействием со стромой.

В работе, посвященной изучению экспрессии рецепторов к половым гормонам на протяжении стадий эстрального цикла, показали, что в строме интенсивность окраски обеих изоформ PR изменялась в течение эстрального цикла с пиком интенсивности в раннем проэструсе и эструсе, что соотвествует максимальной секреции E2 (Mote et al., 2006). В позднем проэструсе интенсивность окраски была минимальной, а концентрация P4 в плазме крови максимальной (Mote et al., 2006).

Несмотря на то, что статистически значимых отличий выявлено не было, мы также обнаружили тенденцию к тому, что P4 в большей степени, чем другие гормональные режимы, ингибирует рост уровня экспрессии PR к 5 сут в обеих культурах (рис. 9).

В другом исследовании подтверждается результат работы Мота с соавторами, полученный уже при изучении матки мыши в начале беременности. В околоимплантационный период фолликулярный E2 обеспечивал подготовку клеток стромы к децидуализации и активировал экспрессию PRs в эндометрии (Zhang et al., 2013). Мы не наблюдали такого эффекта. В группе E2 не происходило роста уровня экспрессии рецепторов на 5 день, превышающего рост в контрольной группе без добавления гормонов. Этот результат может объясняться тем, что E2-зависимый рост PR в клетках стромы *in vivo* обусловлен взаимодействием с эпителием. Возможно также в среде не хватало других про-децидуальных факторов, необходимых для увеличения уровня экспрессии PR в строме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты и проведенный анализ литературы, можно заключить, что контроль экспрессии рецепторов к половым гормонам в большинстве случаев не сводится к простой положительной или отрицательной обратной связи между гормональным сигналом и изменением уровня экспрессии его рецептора. Не все результаты объясняются также и влиянием E2 на экспрессию PR и P4 на экспрессию ER. Почти точно можно заключить, что молекулярный диалог между эпителием и стромой эндометрия играет роль в регуляции экспрессии ER и PR (Honglu et al., 2012). Также на это влияют и другие факторы: сигналы, поступающие от эмбриона, децидуализация стромы. Показано, что различается регуляция экспрессии разных изоформ рецепторов (Mote et al., 2006).

Решение этого уравнения со множеством неизвестных необходимо для разработки адекватных моделей имплантации и для разработки терапевтических подходов для заболеваний, ассоциированных с бесплодием. Затрудняет работу в этом направлении то, что часть более ранних результатов получена с использованием устаревших методов и может считаться достоверной лишь отчасти (Tan et al., 1999; Mote et al., 2006). Наши результаты в целом согласуются с полученными ранее. Однако, они ясно показывают необходимость экспериментов, в которых гормональное влияние будет изучаться на системах с сокультивированием эпителия и стромы. Также расширить понимание вопроса может помочь применение методов секвенирования для оценки изменений транскриптома, вызванных гормональной стимуляцией. Кроме того, более достоверные данные могут быть получены путем анализа 3D культуральных систем, в которых клетки находились бы в более привычных им условиях.

Результаты по изучению полярности клеток эпителия эндометрия также говорят в пользу применения системы 3D культивирования для более точной оценки влияния гормонов на ТЦМ. При этом для исследования подвижности клеток возможно применение 2D моделей ввиду выраженного ответа эпителиальных клеток на гормональное воздействие. В дополнение к этому, для исследования механизмов ТЦМ необходимо использовать нативные клетки эпителия эндометрия, но не опухолевые клетки, для которых свойственен ЭМП.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования (ЦКП) ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-74-30015).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Любовь Измайлова и Анна Гайдамака выполняли эксперименты и написали текст статьи, Олеся Сербина выделила РНК из всех образцов, Екатерина Воротеляк планировала работу и отредактировала текст.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Зурина И.М. Сравнительное исследование эпителио-мезенхимной пластичности соматических клеток человека в условиях 3D культивирования: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т общей патологии и патофизиологии, 2017. 176 с.

Aguilera-Castrejon A., Oldak B., Shani T. et al. Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis // Nature. 2021. V. 593. P. 119–124.

Bedzhov I., Leung C.Y., Bialecka M., Zernicka-Goetz M. *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages // Nat. Protoc. 2014. V. 9. № 12. P. 2732–2739.

Chávez D.J., Anderson T.L. The Glycocalyx of the mouse uterine luminal epithelium during estrus, early pregnancy, the peri-implantation period, and delayed implantation. acquisition of ricinus communis binding sites during pregnancy // Biol. Reprod. 1985. V. 32. № 1135. P. 42.

Clercq K. De, Hennes A., Vriens J. Isolation of mouse endometrial epithelial and stromal cells for *in vitro* decidualization // J. Vis. Exp. 2017. V. 2017. № 121. P. 1–10.

Du F., Yang R., Ma H.L. et al. Expression of transcriptional repressor SNAI2 gene in mouse endometrium and its effect during embryo implantation // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 157. P. 346–355.

Gou J., Hu T., Li L. et al. Role of epithelial-mesenchymal transition regulated by twist basic helix-loop-helix transcription factor 2 (Twist2) in embryo implantation in mice // Reprod. Fertil. Dev. 2019. V. 31. № 5. P. 932–940.

Hamidi H., Lilja J., Ivaska J. Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion // Bio-Protocol. 2017. V. 7. № 24. P. 1–17

Hantak A.M., Bagchi I.C., Bagchi M.K. Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation // Int. J. Dev. Biol. 2014. V. 58. № 2–4. P. 139–146.

Honglu D., Paria B.C., Xiao S. et al. Temporal expression pattern of progesterone receptor in the uterine luminal epithelium suggests its requirement during early events of implantation // Bone. 2012. V. 23. № 1. P. 1–7.

Illingworth I.M., Kiszka I., Bagley S. et al. Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation // Biol. Reprod. 2000. V. 63. P. 1764–1773.

Kallen A.N., Haines K., Taylor H.S. HOXA10 regulates expression of cytokeratin 15 in endometrial epithelial cytoskeletal remodeling // Reprod. Sci. 2014. V. 21. № 7. P. 892–897.

Kaneko Y., Day M.L., Murphy C.R. Integrin β3 in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation in vitro: Studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection // Hum. Reprod. 2011. V. 26. № 7. P. 1665–1674.

Kaneko Y., Lecce L., Day M.L. et al. B1 and B3 integrins disassemble from basal focal adhesions and b3 integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23. № 3. P. 481–495.

Kubaczka C., Senner C., Araúzo-Bravo M.J. et al. Derivation and maintenance of murine trophoblast stem cells under defined conditions // Stem Cell Reports. 2014. V. 2. № 2. P. 232–242.

Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. V. 15. № 3. P. 178–196.

Lin P. F., Lan X.Li., Chen F.L. et al. Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of the mouse uterus in the peri-implantation period // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. P. 4–11.

Liu, Z., Qi, S., Zhao, X. et al. Metformin inhibits 17β-estradiol-induced epithelial-to-mesenchymal transition via βKlotho-related ERK1/2 signaling and AMPKα signaling in endometrial adenocarcinoma cells // Oncotarget. 2016. V. 7. № 16. P. 21315–21331.

Luddi A., Pavone V., Semplici B. et al. Organoids of human endometrium: A powerful *in vitro* model for the endometrium-embryo cross-talk at the implantation site // Cells. 2020. V. 9. № 5. P. 1121.

Mote P.A., Arnett-Mansfield R.L., Gava N. et al. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle // Endocrinology. 2006. V. 147. № 12. P. 5503–5512.

Nieto M.A., Huang R.Y.J., Jackson R.A. et al. // Cell. 2016. V. 166. № 1. P. 21–45.

Olalekan S.A., Burdette J.E., Getsios S. et al. Development of a novel human recellularized endometrium that responds to a 28-day hormone treatment // Biol. Reprod. 2017. V. 96. № 5. P. 971–981.

Quinn C.E., Matson B.C., Wetendorf M. et al. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions // Mol. Cell Endocrinol. 2019. V. 5. P. 501. P. 110644.

Shakya S., Asosingh K., Mack J.A. et al. Optimized protocol for the preparation of single cells from cutaneous wounds for flow cytometric cell sorting and analysis of macrophages // Methods. X. 2020. V. 7. P. 101027.

Tan J., Paria B.C., Dey S.K. et al. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse // Endocrinology. 1999. V. 140. № 11. P. 5310–5321.

Tian H., Xu J.Y., Tian Y. et al. A cell culture condition that induces the mesenchymal-epithelial transition of dedifferentiated porcine retinal pigment epithelial cells // Experimental Eye Research. 2018. V. 177. P. 160–172.

Uchida H., Maruyama T., Oda H. Studies using an *in vitro* model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 4441–4450.

Vasquez Y.M., DeMayo F.J. Role of nuclear receptors in blastocyst implantation // Semin. Cell Dev. Biol. 2013. V. 24. № 10–12. P. 724–735.

Wang H., Dey S.K. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. № 3. P. 185–199.

Whitby S., Zhou W., Dimitriadis E. Alterations in epithelial cell polarity during endometrial receptivity: A systematic review // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2020. V. 11. P. 1–14.

Wilcox A.J., Weinberg C.R., O'Connor J.F. et al. Incidence of early loss of pregnancy // N. Engl. J. Med. 1988. V. 319. № 4. P. 189–194.

Ye T.M., Pang R.T.K., Leung C.O.N. et al. Development and characterization of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events // Fertil. Steril. 2012. V. 98. № 6. P. 1581–1589.

Ye X. Uterine luminal epithelium as the transient gateway for embryo implantation // Trends Endocrinol. Metab. 2020. V. 31. № 2. P. 165–180.

Zhang S., Lin H., Kong S. et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation // Mol. Aspects Med. 2013. V. 34. № 5. P. 939–980.

Influence of Sex Steroids on the Expression of Its Receptors and Migratory Potential of Mouse Epithelial and Stromal Endometrial Cells *In Vitro*

L. Sh. Izmailova[1, *], A. A. Gaidamaka[1], O. O. Serbina[1], and E. A. Vorotelyak[1]

[1]*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*
**e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru*

Preparation for embryo implantation is a complex process that includes changes at both cellular and tissue levels in the epithelium and stroma of the endometrium. The success of future pregnancy depends on the regulation of preimplantation changes in the endometrium and during the onset of the receptive period. Modeling the regulation of endometrial functioning in vitro makes it possible to study the process of preparing the endometrium for embryo implantation, which is especially important for the development of therapeutic approaches for the treatment of diseases associated with infertility. In this work we show the effects of sex steroids on the changes in endometrial epithelium polarity in vitro. Changes in endometrial epithelium polarity are also an important process during in vivo implantation. The mutual influence of estrogen and progesterone, the main regulators of endometrium, on the expression of its receptors is also described.

Keywords: endometrium, epithelium, stroma, epithelial-mesenchymal transition, sex steroids

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 467–475

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 57.032, 577.175.82, 611.81.013

ГИПОТЕЗА ОБ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЕ МОЗГА: ДОКАЗАТЕЛЬСТВА РЕГУЛИРУЕМОГО ПОСТУПЛЕНИЯ НЕЙРОГОРМОНОВ ИЗ МОЗГА В ЛИКВОР И ОБРАТНО У КРЫС В НЕОНАТАЛЬНОМ И ПРЕПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

А. Р. Муртазина[a], Т. С. Пронина[a], К. И. Чандран[a], Л. К. Дильмухаметова[a], Н. С. Бондаренко[a], В. Е. Блохин[a], В. В. Богданов[a], М. В. Угрюмов[a, *]

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: michael.ugrumov@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.06.2021 г.
После доработки 21.07.2021 г.
Принята к публикации 26.07.2021 г.

Накопленная в последние несколько десятилетий обширная информация о важной роли ликвора во многих физиологических процессах в норме и при патологии позволила авторам статьи сформулировать гипотезу о том, что мозг обладает собственной эндокринной системой, представленной: (а) нейронами мозга, секретирующими нейрогормоны в желудочки, (б) ликвором – гуморальной средой, обеспечивающей доставку нейрогормонов в отделы мозга – мишени и (в) нейронами перивентрикулярной области мозга – мишенями для содержащихся в ликворе нейрогормонов. Согласно этой гипотезе, функциональное значение эндокринной системы мозга в онтогенезе смещается от регуляции развития нейронов и мозга в перинатальном периоде к участию в объемной нейротрансмиссии у взрослых животных. Данная работа направлена на проверку этой гипотезы. Так, у неонатальных (5-й день жизни) и взрослых (30-й день жизни) крыс показано, что вещества, содержащиеся в ликворе, участвуют в регуляции секреции моноаминов нейронами мозга в ликвор. Эти данные были получены при перфузии желудочков мозга искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+. Однако стимуляция секреции моноаминов была обнаружена не у всех животных в пределах каждой возрастной группы, что объясняется индивидуальными и возрастными особенностями проницаемости ликвор-энцефалического барьера. Действительно, перфузия срезов мозга в среде с повышенным содержанием K^+, т.е в отсутствие ликвор-энцефалического барьера, неизменно приводила к стимуляции секреции моноаминов у всех животных в обеих возрастных группах. Вторым аргументом в пользу правомочности нашей гипотезы была демонстрация захвата веществ из ликвора в моноаминергические нейроны мозга, которые рассматриваются как потенциальные мишени для эндокринных факторов ликвора. Доказательства этого были получены при введении в желудочки мозга 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодида, обладающего высоким сродством к транспортерам моноаминов. Этот маркер после внутрижелудочкового введения включался в нейроны перивентрикулярной области мозга. Таким образом, получены доказательства того, что вещества, содержащиеся в ликворе у неонатальных и взрослых крыс, участвуют в регуляции секреции моноаминов в желудочки мозга, а моноамины, содержащиеся в ликворе, поступают в мозг и захватываются потенциальными нейронами-мишенями.

Ключевые слова: мозг, ликвор, моноамины, эндокринные регуляции, онтогенез, крысы

DOI: 10.31857/S0475145021060094

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих лет в нейробиологии и неврологии активно обсуждается вопрос о роли ликвора как гуморальной среды в регуляции функционирования мозга и целостного организма. Так, с начала 80-х годов в литературе получены данные, свидетельствующие о том, что: (а) в желудочки мозга прорастают отростки нейронов, (б) в ликвор из мозга поступают физиологически активные вещества – классические нейротрансмиттеры и нейропептиды, (в) физиологически активные вещества, содержащиеся в ликворе, способны влиять на функциональную активность нейронов мозга и участвовать в эндокринных регуляциях у взрослых животных, (г) физиологически активные вещества, содержащиеся в ликворе, способны влиять на развитие нейронов и мозга в целом в онтогенезе (Ugrumov, Mitskevich, 1980, 1981; Black, 1982; Ugrumov et al., 1985; Ugrumov, 1991; Sakka et al., 2011; Bjorefeldt et al., 2018; Ghersi-Egea et al., 2018; Jalavand et al., 2018; Bothwell et al., 2019; Gato et al., 2019; Shapey et al., 2019). Несмотря на то, что накоплено обилие данных по указанной проблеме, они в каждой работе носят фрагментарный характер и получены на разных объектах с помощью разных методических подходов.

Настало время для обобщения приведенных выше данных и их представления в виде концепции аутоэндокринной регуляции функционирования мозга на различных этапах онтогенеза, которая должна пройти последовательную экспериментальную проверку на одной и той же модели. В этом контексте данная работа посвящена продолжению проверки нашей гипотезы о том, что мозг имеет собственную эндокринную систему, включающую три взаимосвязанных структурно-функциональных блока: нейроны мозга, секретирующие нейрогормоны в желудочки мозга, ликвор – гуморальная среда, обеспечивающая депонирование нейрогормонов и транспорт вдоль желудочков мозга в рострокаудальном направлении, и нейроны, расположенные в перивентрикулярной области мозга – мишени для нейрогормонов, содержащихся в ликворе (Муртазина и др., 2021). В рамках этой гипотезы подчеркивается, что роль эндокринной системы мозга качественно меняется в онтогенезе – от участия в регуляции развития нейронов и мозга в целом в перинатальном периоде до “объемной нейротрансмиссии” у взрослых животных, т.е. нейромодуляторном действии на рецепторы, распределенные по мембране всего нейрона, а не только в области синапсов (Fuxe, Borroto-Escuela, 2016). Важно отметить, что при системной оценке функционального значения эндокринной системы мозга следует иметь в виду, что она не полностью автономна, а сообщается с общей эндокринной и нейроэндокринной системой, в основном в области хориоидного сплетения в боковых желудочках мозга и в “циркумвентрикулярных органах” мозга (Bueno et al., 2019).

В нашей предыдущей (Муртазина и др., 2021) и в этой работе в качестве маркеров эндокринной функции мозга по ряду причин были выбраны моноамины. Во-первых, моноамины – в основном дофамин, норадреналин и серотонин, широко распространены по мозгу, участвуя у взрослых животных в синаптической и объемной нейротрансмиссии, а в перинатальном периоде в регуляции развития нейронов и мозга в целом (Ugrumov, 1997; Gaspar et al., 2003; Fuxe, Borroto-Escuela, 2016). Во-вторых, в предыдущих работах показано, что моноаминергические нейроны проецируют аксоны в желудочки мозга, а в ликворе выявляются моноамины и их метаболиты (Ugrumov et al., 1985; Shaywitz et al., 1985).

В нашей предыдущей работе, посвященной проверке гипотезе о том, что мозг имеет собственную эндокринную систему, показано, что: (1) в ликворе у взрослых крыс и в перинатальном периоде содержатся наиболее функционально значимые моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин, (2) моноамины, содержащиеся в ликворе, имеют нейрональное (мозговое) происхождение, а не поступают из общей системы циркуляции, (3) моноамины содержатся в ликворе в физиологически активной концентрации, в которой они способны участвовать в регуляции развития нейронов в перинатальном периоде, а у взрослых животных – в объемной нейротрансмиссии (Муртазина и др., 2021).

Целью данной работы явилось получение дополнительных доказательств гипотезы о существовании эндокринной системы мозга. В рамках первой задачи предполагалось проверить, могут ли изменения в составе ликвора приводить к изменению поступления нейротрансмиттеров (моноаминов) из мозга в ликвор. В качестве такого рода неспецифического регулятора предполагалось использовать повышенное содержание K^+ в ликворе и в межклеточной среде в мозге, имитирующее деполяризацию мембраны и, таким образом, стимулирующее выделение нейротрансмиттеров экзоцитозом (Ait Ouares et al., 2019). В рамках второй задачи предполагалось получить доказательство того, что циркулирующие в ликворе физиологически активные вещества (моноамины) поступают в мозг и захватываются нейронами, что является необходимым условием для их эндокринной регуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В работе использованы крысы Вистар – самцы на 5-й постнатальный день (П5) и на П30 (рис. 1). Для получения датированного потомства были использованы беременные самки Вистар весом 250–350 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-ти часовом режиме день-ночь. Манипуляции с животными проводили под наркозом. В одних опытах использовали хлоралгидрат (Sigma, США) в дозе 100 мг/кг на П5 и в дозе 400 мг/кг на П30, а в других 1% изофлуран (Laboratorios Karizoo, Испания).

Приготовление и инкубация перфузией срезов мозга

Крыс на П5 ($n = 8$) и П30 ($n = 4$) наркотизировали изофлураном, декапитировали и выделяли мозг (рис. 1). Затем на вибратоме (Vibratome 1000 plus, Sectioning System, Германия) в буфере Кребса-Рингера (БКР) (мМ: NaCl 120, KCl 4.8, $CaCl_2$ 2,

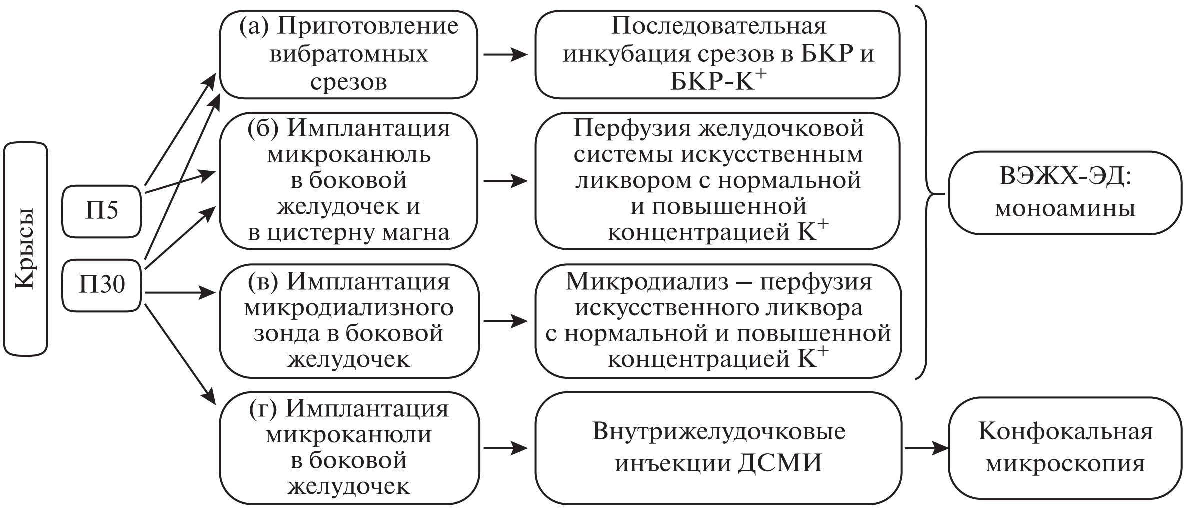


Рис. 1. Схема экспериментов на крысах: (а) определение влияния повышенного содержания К$^+$ в буфере Кребса-Рингера (БКР) на выделение моноаминов из срезов мозга на П5 и П30, (б) определение влияния повышенного содержания К$^+$ в искусственном ликворе на поступление моноаминов из мозга в желудочковую систему на П5 и П30, (в) микродиализное определение влияния повышенного содержания К$^+$ в ликворе на состав моноаминов в боковых желудочках мозга на П30, (г) оценка поступления из желудочков мозга в клетки мозга 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодида (ДСМИ). ВЭЖХ-ЭД, высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; П, постнатальный день.

$MgSO_4$ 1.3, $NaHCO_3$ 25, d-глюкоза 10, HEPES 20, аскорбиновая кислота 0.1, pH 7.4) при 4°C приготавливали серийные фронтальные срезы мозга толщиной, в зависимости от возраста животного, от 300 до 600 мкм. В качестве ориентиров на вентральной поверхности мозга использовали оптическую хиазму – рострально, и стебель гипофиза – каудально.

Из полученных вибратомных срезов вырезали перивентрикулярную область гипоталамуса. На П5 в качестве одной пробы (образца) для инкубации использовали срезы от одного животного. На П30 вибратомные срезы разрезали по 3-му желудочку и в качестве каждой пробы использовали половинки срезов от одного животного. Пробы инкубировали в проточных термостатируемых камерах объемом 400 мкл при 37°C со скоростью 100 мкл/мин. В течение первых 40 минут срезы инкубировали (стабилизировали) в БКР, а затем последовательно по 30 минут в БКР и в БКР с повышенным содержанием К$^+$ (мМ: NaCl 68.8, KCl 56, $CaCl_2$ 2, $MgSO_4$ 1.3, $NaHCO_3$ 25, d-глюкоза 10, HEPES 20, аскорбиновая кислота 0.1, pH 7.4). В течение последнего часа собирали 10-минутные фракции. После окончания инкубации срезов в отобранные фракции инкубационной среды добавляли по 100 мкл 1 М $HClO_4$ и по 2 пмоль/мл 3,4-дигидроксибензиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта для высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Полученные образцы замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до определения моноаминов – дофамина, норадреналина и серотонина методом ВЭЖХ-ЭД.

Перфузия желудочков мозга

Крыс (рис. 1) на П5 ($n = 8$) и П30 ($n = 9$) наркотизировали хлоралгидратом, голову фиксировали в стереотаксической установке (Narishige Lab, Япония) и высверливали отверстие в черепе над боковыми желудочками по следующим координатам: на П5 – 1.2 мм латеральнее брегмы и каудально – на уровне брегмы, а на П30 – 1.4 мм латеральнее брегмы и на 0.4 мм каудальнее брегмы. После этого в мозг вводили стеклянную микроканюлю на П5 на глубину 2.5 мм, а на П30 на глубину 3 мм. Вторую микроканюлю вводили в цистерну магна через атланто-затылочную соединительнотканную мембрану для обеспечения пассивного оттока ликвора. Через первую микроканюлю, соединенную с гамильтоновским шприцом, перфузировали желудочки мозга с постоянной скоростью – 5 мкл/мин на П5 и 10 мкл/мин на П30 с помощью микронасоса CMA 4004 (CMA, Швеция). Первые 20 минут желудочки мозга перфузировали искусственным ликвором (126 мМ NaCl, 26 мМ $NaHCO_3$, 3 мМ KCl, 1.2 мМ NaH_2PO_4, 2.4 мМ $CaCl_2$, 1.2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ d-глюкоза), а последующие 20 мин – искусственным ликвором с повышенным содержанием К$^+$ (73 мМ NaCl, 26 мМ $NaHCO_3$, 56 мМ KCl, 1.2 мМ NaH_2PO_4, 2.4 мМ $CaCl_2$, 1.2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ d-глюкоза). В процессе перфузии собирали 10-минутные фракции в пробирки, содержащие 0.1 М $HClO_4$ и 25 пмоль/мл

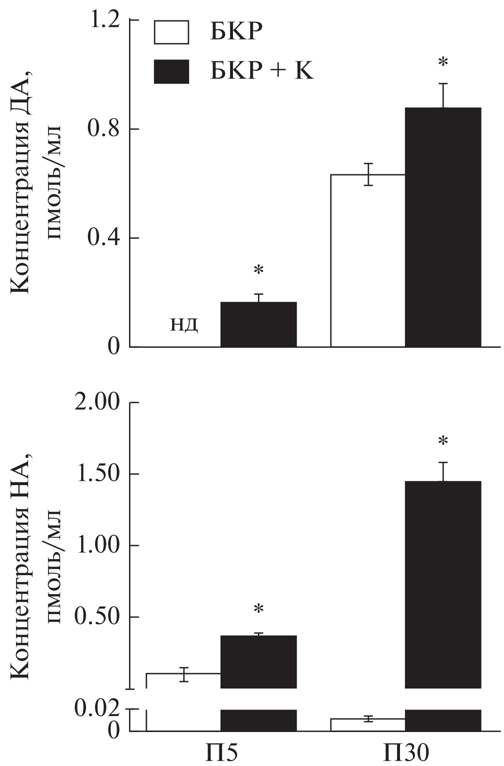


Рис. 2. Концентрация моноаминов в перфузате при проточной инкубации срезов мозга крыс на 5-й постнатальный день (П5) и П30 сначала буфером Кребс-Рингера (БКР), а затем БКР с повышенным содержанием K^+ (БКР + К). * $P < 0.05$, при сравнении групп инкубированных в БКР с повышенным содержанием K^+ и БКР. ДА, дофамин; НА, норадреналин; нд, не детектируется.

ДГБА. Полученные перфузаты замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до определения моноаминов с помощью ВЭЖХ-ЭД.

Микродиализ ликвора в боковых желудочках мозга на П30

Помимо перфузии через всю желудочковую систему мозга, у крыс на П30 ($n = 4$) проводили микродиализ в боковых желудочках (рис. 1). Для этого крысам под наркозом хлоралгидратом в боковой желудочек мозга вводили направляющую канюлю для микродиализного зонда (CMA-11 Guide Cannula, CMA, Швеция). Канюлю фиксировали на кости черепа с помощью микроболтов и стоматологического полимера (Протакрил-М, Украина). Через 48 ч в направляющую канюлю вводили микродиализный зонд (CMA 11 55 kDa Microdialysis Probe, CMA, Швеция), заполненный искусственным ликвором. Зонд с помощью силиконовых трубочек подсоединяли к насосу CMA 4004 (CMA, Швеция). Через 3 ч после введения зонда боковые желудочки перфузировали со скоростью 2 мкл/мин сначала 60 мин искусственным ликвором, а затем 60 мин искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+, собирая в обоих случаях 20-минутные фракции. К полученным диализатам добавляли 4 мкл 1 М $HClO_4$, замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до определения моноаминов и в ряде случаев продуктов их деградации на ВЭЖХ-ЭД.

Внутрижелудочковое введение 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодида

В один из боковых желудочков мозга у крыс на П30 ($n = 4$) под наркозом хлоралгидрата имплантировали стеклянную микроканюлю, заполненную БКР с 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодид (ДСМИ) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкМ (рис. 1). Далее 10 мкл этого раствора вводили с помощью гамильтоновского шприца со скоростью 2 мкл/мин. Через 30 мин после окончания инъекции приготавливали вибратомные срезы диэнцефалона толщиной 150 мкм, которые анализировали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 или LSM 880 Airyscan (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация моноаминов в перфузате при проточной инкубации срезов мозга БКР с обычным и повышенным содержанием K^+

При проточной инкубации срезов, полученных у крыс на П5 и П30, с БКР дофамин определяется только на П30 (рис. 2). При последующей инкубации этих же срезов в БКР с повышенным содержанием K^+ дофамин определяется на П5, а на П30 его концентрация достоверно возрастает по сравнению с контролем (обычный БКР).

При проточной инкубации срезов, полученных у крыс на П5 и П30, с БКР норадреналин определяется как на П5, так и на П30. При последующей инкубации этих же срезов в БКР с повышенным содержанием K^+ концентрация норадреналина достоверно возрастает на П5 и П30.

Концентрация моноаминов в перфузате при перфузии желудочковой системы мозга искусственным ликвором с обычным и повышенным содержанием K^+

У крыс на П5 и П30 обнаружена отчетливая тенденция (П5: $p = 0.066$; П30: $p = 0.067$) к увеличению концентрации дофамина в ликворе с повышенным содержанием K^+ по сравнению с его концентрацией при перфузии желудочков мозга обычным искусственным ликвором (рис. 3). Более того, перфузия желудочковой системы мозга ликвором с повышенным содержанием K^+ приводила к достоверному увеличению концентрации норадреналина на П5 и серотонина на П30. Однако при таком же воздействии отсутствовало достоверное повышение концентрации норадреналина у крыс на П30 и серотонина у крыс на П5 (рис. 3). Это объясняется тем, что при перфузии желудочков мозга искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+ в отдельных возрастных группах не у всех животных повышалась концентрация упомянутых моноаминов. Так, например, при перфузии искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+ на П30 у 6-ти животных концентрация норадреналина была повышена в 1.35 раза, а у остальных трех животных изменения концентрации норадреналина не было обнаружено.

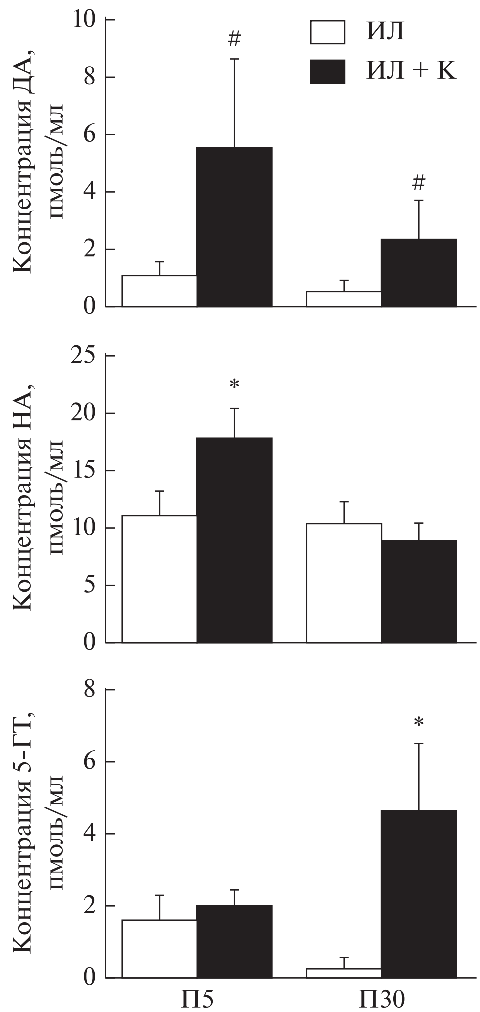


Рис. 3. Концентрация моноаминов в искусственном ликворе (ИЛ) и в искусственном ликворе с повышенным содержанием K^+ (ИЛ + К) в процессе перфузии этими растворами желудочковой системы мозга у крыс на 5-й постнатальный день (П5) и П30. $*P < 0.05$, при сравнении групп инкубированных в ИЛ с повышенным содержанием K^+ и ИЛ; $^{\#}0.5 < P < 0.1$, при сравнении групп, инкубированных в ИЛ с повышенным содержанием K^+ и в ИЛ. 5-ГТ, 5-гидрокситриптамин (серотонин); ДА, дофамин; НА, норадреналин.

Состав моноаминов в ликворе боковых желудочков мозга при микродиализной перфузии искусственным ликвором с обычным и повышенным содержанием K^+

У всех четырех крыс, которым на П30 проводили микродиализную перфузию боковых желудочков искусственным ликвором, в диализате определялись только продукты деградации моноаминов, 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота – продукт деградации дофамина, и 5-гидроксииндолуксусная кислота – продукт деградации серотонина. При микродиализной перфузии искусственным ликвором с повышенным содержанием калия у двух животных из четырех в диализате дополнительно определялся дофамин, а у одного из этих животных еще и адреналин.

Включение 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодида, введенного в желудочки мозга крысам на П30, в нейроны перивентрикулярной области диэнцефалона

После введения ДСМИ в БКР (10 мкМ) в течение 5 мин в боковые желудочки мозга крысам на П30 наблюдается избирательное окрашивание би- и мультиполярных нейронов – тел нейронов и их отростков, содержащихся в основном в перивентрикулярной области мозга (рис. 4). Одни нейроны мозаично рассредоточены по нервной ткани, а другие – образуют ядерные скопления.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа является вторым исследованием, посвященном проверке нашей гипотезы о том, что мозг имеет собственную эндокринную систему, представленную: (а) нейронами мозга, секретирующими нейрогормоны в желудочки мозга, (б) ликвором – гуморальной средой, обеспечивающей доставку нейрогормонов в отделы мозга – мишени и (в) нейронами перивентрикулярной области мозга – мишенями для содержащихся в ликворе физиологически активных веществ. Более того, согласно этой гипотезе, функциональное значение эндокринной системы мозга в онтогенезе смещается от регуляции развития нейронов и мозга в перинатальном периоде к участию в объемной нейротрансмиссии у взрослых животных (Муртазина и др., 2021).

После того, как в первой работе было показано, что в ликворе у неонатальных крыс (П5) – в период морфогенеза, и у крыс в препубертатном

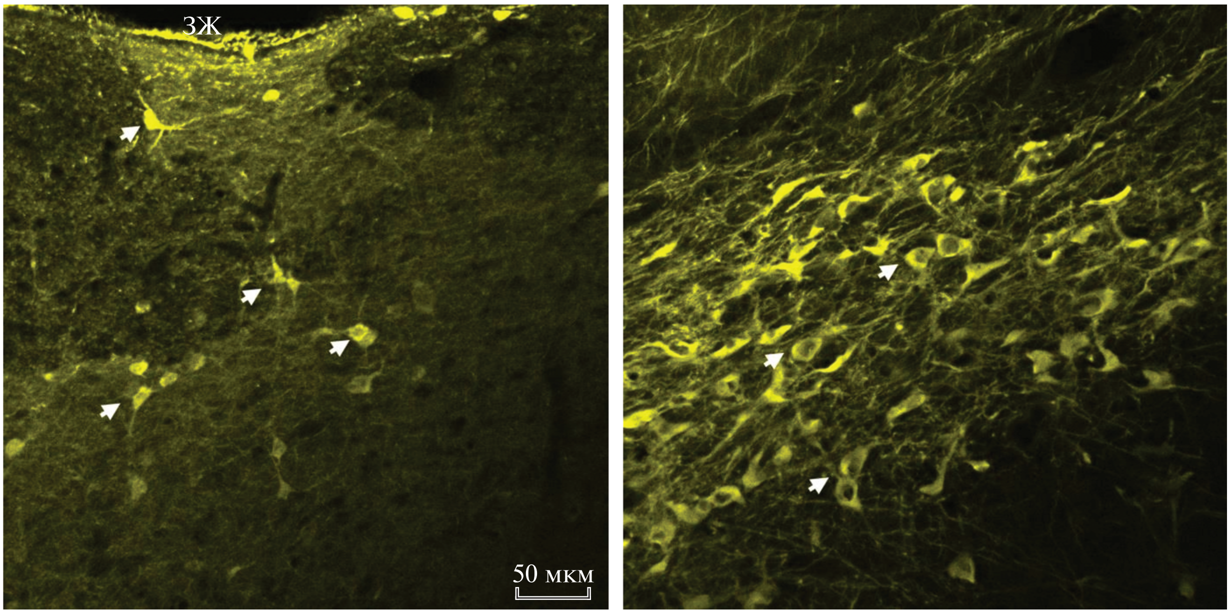


Рис. 4. Включение 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиниум иодида, введенного в боковой желудочек мозга крысам на 30-й постнатальный день, в нейроны перивентрикулярной области диэнцефалона. 3Ж – 3-й желудочек мозга, стрелки – меченые нейроны. Масштаб 50 мкм.

периоде (П30) – после окончания морфогенеза, содержатся моноамины, причем в физиологически активной концентрации (Муртазина и др., 2021), встал вопрос, является ли поступление нейрогормонов из мозга в ликвор процессом, регулируемым веществами, входящими в состав ликвора. Для того, чтобы прояснить этот вопрос, в данной работе была проведена перфузия всей желудочковой системы мозга, а также локальная микродиализная перфузия в боковых желудочках сначала искусственным ликвором, а затем искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+. Ожидалось, что перфузия желудочков мозга искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+ стимулирует выделение экзоцитозом моноаминов из моноаминергических нейронов мозга и усилит поступление моноаминов в ликвор. Однако по результатам проведенных экспериментов картина оказалась не такой однородной. Так, при перфузии желудочковой системы мозга на П5 и П30 искусственным ликвором с повышенным содержанием K^+ у одних животных в пределах одной и той же возрастной группы наблюдалось ожидаемое достоверное повышение концентрации моноаминов в перфузате, а у других – нет. Поэтому, в зависимости от соотношения животных с различной реакцией на калиевую стимуляцию, в каждой возрастной группе в оттекающем ликворе наблюдалось либо достоверное увеличение концентрации моноаминов (норадреналин на П5, серотонин на П30), либо тенденция к увеличению концентрации моноаминов (дофамин на П5 и П30), либо отсутствие изменений в концентрации моноаминов (норадреналин на П30, серотонин на П5). Одним из объяснений этих различий могут быть возрастные и индивидуальные особенности в проницаемости ликвор-энцефалического барьера, основным структурно-функциональным звеном которого является слой эпендимных клеток. Хотя этот вопрос крайне мало изучен, имеются доказательства того, что ликвор-энцефалический барьер избирательно проницаем, причем его проницаемость существенно изменяется в онтогенезе (Saunders, 2013; Shapey et al., 2019).

Дополнительные опыты с микродиализом ликвора в боковых желудочках у крыс на П30 были проведены для того, чтобы проверить поступают ли моноамины из мозга или из сосудов хориоидного сплетения в ликвор в самой ростральной области желудочковой системы мозга – на начальном этапе образования ликвора. На этот вопрос был получен отрицательный ответ – при перфузии боковых желудочков искусственным ликвором моноамины в перфузате не были обнаружены. Однако при микродиализной перфузии искусственного ликвора с повышенным содержанием калия в перфузате у двух животных из четырех были обнаружены моноамины – дофамин и адреналин. Из сопоставления данных, полученных при перфузии всей желудочковой системы мозга и только боковых желудочков, следует, что моноамины поступают из мозга в ликвор в более каудальных отделах по отношению к боковым желудочкам.

Для того, чтобы понять, действительно ли в ряде наших экспериментов ликвор-энцефалический барьер препятствует поступлению искусственного ликвора с повышенным содержанием K^+ из желудочков в мозг, было изучено влияние инкубационной среды (БКР) с повышенным содержанием K^+ на выделение моноаминов из срезов перивентрикулярной области мозга, полученных у крыс в тех же возрастных группах (П5 и П30). Такой сравнительный подход *in vivo* и *in vitro* к оценке проницаемости ликвор-энцефалического барьера был успешно использован ранее (Bjorefeldt et al., 2018). По нашим данным, воздействие на срезы БКР с повышенной концентрацией K^+ – в отсутствие ликвор-энцефалического барьера, стимулировало выделение дофамина и норадреналина из срезов мозга в обеих возрастных группах. В этих же экспериментах в инкубационной среде ни в опыте, ни в контроле не определялся серотонин, что, очевидно, объясняется гораздо более низкой плотностью иннервации гипоталамуса серотонинергическими нервными волокнами по сравнению с дофаминергическими и норадренергичскими.

Полученные данные о калий-стимулированном выделении катехоламинов из срезов гипоталамуса подтверждают наше предположение о том, что наблюдаемые индивидуальные и возрастные различия в изменении концентрации моноаминов в перфузате при перфузии желудочков мозга искусственным ликворов с повышенным содержанием K^+ объясняются индивидуальными и возрастными особенностями проницаемости ликвор-энцефалического барьера.

Второй задачей данной работы было получение доказательств того, что содержащиеся в ликворе вещества могут поступать в мозг и захватываться нейронами. Для доказательства такого транспорта в качестве маркера был использован ДСМИ – лиганд многих клеточных транспортеров, который, однако, имеет особенно высокое сродство к транспортерам моноаминов, особенно к мембранному транспортеру дофамина (Inyushin et al., 2013; Urra et al., 2014). В нашей работе было показано, что через 30 мин после введения ДСМИ в боковые желудочки крысам на П30, флуоресцирующие меченые нейроны мозаично распределены в перивентрикулярной области диэнцефалона или даже образуют крупные ядерно-подобные скопления. По всей вероятности, это дофаминергические нейроны, поскольку норадренергические и серотонинергические нейроны располагаются в гораздо более каудальных отделах мозга. Полученные данные подтверждают представления о том, что содержащиеся в ликворе вещества могут участвовать в регуляции нейронов, расположенных в перивентрикулярной области мозга (Bothwell et al., 2019).

Таким образом, на примере моноаминов было показано, что у неонатальных и взрослых крыс вещества, содержащиеся в ликворе, поступают в мозг и могут оказывать эндокринное влияние на секрецию нейротрансмиттеров нейронами мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 20-14-00325).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями “Национальных Институтов Здоровья” (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) и комитета по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова (протокол № 3 от 10.09.2020 и протокол № 44 от 24.12.2020). (Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов исследования.)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

М.В. Угрюмов участвовал в постановке работы, анализе результатов и написании статьи; Т.С. Пронина – в анализе результатов и оформлении статьи; Л.К. Дильмухаметова, К.И. Чандран, Т.С. Пронина – в проведении экспериментов *in vitro* на срезах; А.Р. Муртазина, Н.С. Бондаренко, К.И. Чандран – в проведении экспериментов *in vivo* при перфузии желудочков, В.В. Богданов, К.И. Чандран, Т.С. Пронина – в проведении экспериментов *in vivo* при микродиализе желудочков, В.Е. Блохин, А.Р. Муртазина, Т.С. Пронина – в проведении экспериментов *in vivo* с ДСМИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Муртазина А.Р., Бондаренко Н.С., Пронина Т.С. и др. Ликвор как гуморальная среда эндокринной системы мозга в онтогенезе // Acta Naturae. 2021. Т. 13. № 4. В печати.

Ait Ouares K., Filipis L., Tzilivaki A. et al. Two distinct sets of Ca^{2+} and K^+ channels are activated at different membrane potentials by the climbing fiber synaptic potential in purkinje neuron dendrites // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 11. P. 1969–1981.

Bjorefeldt A., Illes S., Zetterberg H. et al. Neuromodulation via the cerebrospinal fluid: Insights from recent *in vitro* studies // Front. Neural. Circuits. 2018. V. 12. Art. 5.

Black P.M. Neuropeptides in cerebrospinal fluid // Neurosurgery. 1982. V. 11. № 4. P. 550–555.

Bothwell S.W., Janigro D., Patabendige A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases // Fluids Barriers CNS. 2019. V. 16. № 1. Art. 9.

Bueno D., Parvas M., Nabiuni M. et al. Embryonic cerebrospinal fluid formation and regulation // Semin. Cell Dev. Biol. 2020. V. 102. P. 3–12.

Fuxe K., Borroto-Escuela D.O. Volume transmission and receptor-receptor interactions in heteroreceptor complexes: understanding the role of new concepts for brain communication // Neural. Regen. Res. 2016. V. 11. № 8. P. 1220–1223.

Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. № 12. P. 1002–1012.

Gato A., Alonso M.I., Lamus F. et al. Neurogenesis: A process ontogenically linked to brain cavities and their content, CSF // Semin. Cell. Dev. Biol. 2020. V. 102. P. 21–27.

Ghersi-Egea, J.F., Strazielle, N., Catala, M. et al. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease // Acta Neuropathol. 2018. V. 135. P. 337–361.

Inyushin M.U., Arencibia-Albite F., de la Cruz A. et al. New method to visualize neurons with DAT in slices of rat VTA using fluorescent substrate for DAT, ASP+ // J. Neurosci. Neuroeng. 2013. V. 2. № 2. P. 98–103.

Jalalvand E., Robertson B., Tostivint H. et al. Cerebrospinal fluid-contacting neurons sense pH changes and motion in the hypothalamus // J. Neurosci. 2018. V. 38. № 35. P. 7713–7724.

Sakka L., Coll G., Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid // Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head. Neck. Dis. 2011. V. 128. № 6. P. 309–316.

Saunders N.R., Daneman R., Dziegielewska K.M. et al. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult // Mol. Aspects. Med. 2013. V. 34. № 2–3. P. 742–752.

Shapey J., Toma A., Saeed S.R. Physiology of cerebrospinal fluid circulation // Curr. Opin. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. 2019. V. 27. № 5. P. 326–333.

Shaywitz B.A., Anderson G.M., Cohen D.J. Cerebrospinal fluid (CSF) and brain monoamine metabolites in the developing rat pup // Brain Res. 1985. V. 349. № 1–2. P. 225–232.

Ugrumov M.V, Mitskevich M.S. The adsorptive and transport capacity of tanycytes during the perinatal period of the rat // Cell Tiss. Res. 1980. V. 211. № 3. P. 493–501.

Ugrumov M.V, Taxi J., Mitskevich M.S. et al. Immunocytochemical and radioautographic study of serotonin projections to cerebral ventricles of perinatal rats // Brain Res. 1985. V. 350. P. 225–230.

Ugrumov M.V. Developing hypothalamus in differentiation of neurosecretory neurons and in establishment of pathways for neurohormone transport // Int. Rev. Cytol. 1991. V. 129. P. 207–267.

Ugrumov M.V. Hypothalamic monoaminergic system in ontogenesis: development and functional significance // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. № 6. P. 809–816.

Ugrumov M.V., Mitskevich M.S. Interrelations between neural elements and tanycytes during the perinatal period of the rat // Cell Tiss. Res. 1981. V. 215. № 3. P. 633–641.

Ugrumov M.V., Taxi J., Mitskevich M.S. et al. Immunocytochemical and radioautographic study of serotonin projections to cerebral ventricles of perinatal rats // Brain Res. 1985. V. 350. № 1–2. P. 225–230.

Urra J.A., Villaroel-Espíndola F., Covarrubias A.A. et al. Presence and function of dopamine transporter (DAT) in stallion sperm: dopamine modulates sperm motility and acrosomal integrity // PLoS One. 2014. V. 9. № 11. Art. e112834.

The Hypothesis on the Endocrine System of the Brain: Evidence for the Regulated Delivery of Neurohormones from the Brain to the Cerebrospinal Fluid and Vice Versa in Neonatal and Prepubertal Periods of Ontogenesis

A. R. Murtazina[1], T. S. Pronina[1], K. I. Chandran[1], L. K. Dilmukhametova[1], N. S. Bondarenko[1], V. E. Blokhin[1], V. V. Bogdanov[1], and M. V. Ugrumov[1,*]

[1]Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
**e-mail: michael.ugrumov@mail.ru*

The extensive information accumulated over the past few decades on the important role of cerebrospinal fluid in many physiological processes in norm and pathology, allowed the authors of the paper to express a hypothesis that the brain has its own endocrine system, represented by: (a) brain neurons secreting neurohormones into the ventricles, (b) cerebrospinal fluid – a body fluid that ensures the delivery of neurohormones to the brain target regions, and (c) neurons of the periventricular region of the brain – targets for neurohormones contained in the cerebrospinal fluid. According to this hypothesis, the functional significance of the endocrine system of the brain in ontogenesis moves from the regulation of the neuron and brain development in the perinatal period to participation in volume neurotransmission in adulthood. This study is aimed at testing this hypothesis. So, in neonatal (5th day of life) and adult (30th day of life) rats, it was shown that substances contained in the cerebrospinal fluid are involved in the regulation of monoamine secretion by brain neurons into the cerebrospinal fluid. These data were obtained by perfusion of cerebral ventricles with artificial cerebrospinal fluid with an increased content of K^+. However, stimulation of the secretion of monoamines was not found in all animals within each age group, which is explained by the individual and age-related characteristics of the cerebrospinal fluid-brain barrier permeability. Indeed, perfusion of brain slices in the incubation medium with an increased content of K^+ (in the absence of a cerebrospinal fluid-brain barrier) invariably led to the stimulation of monoamine secretion in all animals in both age groups. The second proof of the validity of our hypothesis was the demonstration of the uptake of substances from the cerebrospinal fluid into monoaminergic neurons of the brain, which are considered as potential targets for the endocrine factors of the cerebrospinal fluid. Evidence of this was obtained with the introduction into the cerebral ventricles of 4-[4-(dimethylamino)styryl]-N-methylpyridinium iodide, which has a high affinity for monoamine transporters. This marker after intraventricular administration was incorporated into neurons in the periventricular region of the brain. Thus, evidence has been obtained that the substances contained in the cerebrospinal fluid in neonatal and adult rats are involved in the regulation of the secretion of monoamines in the cerebral ventricles, and monoamines contained in the cerebrospinal fluid enter the brain and are captured by potential target neurons.

Keywords: brain, cerebrospinal fluid, monoamines, endocrine regulation, ontogenesis, rats

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 476–484

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 591.31

РОЛЬ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *APIS MELLIFERA*

© 2021 г. Д. В. Богуславский[a], *, И. С. Захаров[a]

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

**e-mail: boguslavsky@rambler.ru*

Поступила в редакцию 08.06.2021 г.
После доработки 23.07.2021 г.
Принята к публикации 27.07.2021 г.

Эмбриональное развитие медоносных пчел изучается уже более 150 лет (Bütschli, 1870) и накоплено множество данных об эмбриогенезе *Apis mellifera* L., но в современной эмбриологии насекомых пчелы как объект исследования используются пока мало. Помимо значения пчел как опылителей и продуцентов биологически активных веществ, представляет большой интерес участие социального поведения в контроле за ходом индивидуального развития этих перепончатокрылых. В настоящем обзоре приведены сведения о внешних факторах (биотических и абиотических), влияющих на эмбриогенез *A. mellifera*, в том числе связанных с социальным поведением.

Ключевые слова: медоносная пчела, эмбриогенез, пчелиная матка, пчелы-трутовки, партеногенез, полиандрия, оофагия, egg policing, *Apis mellifera*

DOI: 10.31857/S0475145021060021

ВВЕДЕНИЕ

Онтогенез одного из самых известных перепончатокрылых насекомых – *A. mellifera* обладает рядом особенностей, придающих, медоносной пчеле уникальность как объекту биологии развития. Главное в биологии медоносной пчелы – это ее существование как общественного насекомого в структурированной колонии-семье. Социальные взаимодействия регулируют структуру колонии пчел. В основе колонии *A. mellifera* находится пчелиная матка – в норме единственная яйцекладущая особь, которая откладывает от нескольких до 3000 яиц в сутки в период с февраля по октябрь (Nolan, 1927). На 7–10 день после выхода из маточника – специальной ячейки большого размера, – молодая матка совершает от одного до нескольких брачных вылетов, во время которых спаривается с несколькими трутнями (Тряско, 1951), сперматозоиды от которых сохраняют жизнеспособность в семяприемнике матки до восьми лет. Яйцекладущая матка не способна ни собирать пищу, ни кормить личинок, ни устраивать жилище. Все эти функции в семье выполняют рабочие пчелы. При соответствующих условиях пчелиная матка может жить до восьми лет (Seeley, 1995). Все остальные члены пчелосемьи имеют более короткий срок жизни: рабочие пчелы, выведшиеся летом, живут около месяца, осенние – до весны, трутни тоже живут не более нескольких месяцев, погибая либо сразу после копуляции, либо в конце лета – начале осени, когда их перестают кормить рабочие пчелы. При отсутствии поступления в пчелосемью нектара в теплое время года матка может прерывать яйцекладку на длительный период, и тогда колония может погибнуть. При обильном поступлении нектара в пчелосемье может присутствовать несколько яйцекладущих маток, но к осени всегда остается лишь одна. Таким образом биологический цикл колонии во многом определяется циклом жизни пчелиной матки. Нарушение этих механизмов, как правило, приводит к гибели семьи. Например, при беспокойстве колонии паразитами, вредителями, или при недостаточной естественной вентиляции гнезд в зимний период, а также в случае аномально теплой погоды, возможна ранняя яйцекладка маткой, что обычно вызывает гибель колонии пчел.

Большой интерес представляет египетский подвид медоносной пчелы, названый в честь Ж.Б. Ламарка – *Apis mellifera lamarckii.* В отличие от других представителей вида, египетские пчелы не собирают прополис, не собираются в зимний клуб, в их гнездах встречаются так называемые полуматки (вспомогательные матки) – промежуточные по морфологии особи, сочетающие признаки рабочих пчел и маток (Zeid, 2001). У полуматок развитый спермоприемник и возможно они спариваются с трутнями. Эмбриогенез *A. mellifera lamarckii* длится в среднем 66 ч (72 ч у представителей других подвидов), что предположительно является адаптацией к засушливому климату (Zeid, 2020).

Первое наиболее полное описание эмбриогенеза медоносной пчелы, выполненное с помощью светового микроскопа, опубликовано Нельсоном (Nelson, 1915). Его работа была расширена в отношении раннего эмбриогенеза Шнеттером (Schnetter, 1934). Дю Про, используя работы Нельсона и Шнеттера, а также свои наблюдения, выделил и описал десять стадий эмбриогенеза, видимых в яйце *A. mellifera* (Du Praw, 1967). Геном медоносной пчелы полностью секвенирован и опубликован в 2006 году (The Honey Bee Genome Sequencing, 2006 г.). В 2014 геном был пересмотрен с использованием новых технологий и проведено глубокое секвенирование транскриптома семи тканей пчелы (Elsik et al., 2014). Эти данные стимулируют исследования эпигенетических механизмов регуляции индивидуального развития пчел, а также формирования поведенческих программ, специфичных для пчелиных каст. Личиночная стадия развития пчелы особенно популярна в качестве модели эпигенетических перестроек (Sieber et al., 2021), однако исследования зародышевого развития – эмбриогенеза медоносной пчелы на молекулярном и генетическом уровне пока еще немногочисленны и неполны.

МОРФОЛОГИЯ ЯИЦ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТКИ

Яйцо медоносной пчелы представляет собой билатерально-симметричную клетку с плотной наружной оболочкой – хорионом, образовавшейся за счет отмерших клеток фолликулярного эпителия. Внутренняя часть яйца, ограниченная оболочкой, представлена ядром и цитоплазмой. Значительная часть цитоплазмы занята желтком, который служит запасом питательных веществ для развития зародыша.

Яйцо пчелы имеет вытянутую цилиндрическую форму и слегка изогнуто. Дорсальная сторона яйца вогнута, а вентральная выпуклая, что характерно для формы яйца у Двукрылых (Diptera) и Перепончатокрылых (Hymenoptera). В яйце выделяют передний и задний концы. Яйцо движется в яйцеводе задним, слегка зауженным концом вперед. В этой части яйца позднее будет формироваться брюшко личинки. В переднем, слегка расширенном конце яйца позднее будет развивается голова личинки.

Длина яйца составляет 1.49 ± 0.12 (диапазон 1.12–1.85) мм, ширина – 0.35 ± 0.02 (диапазон 0.30–0.40) мм. Объем яйца – 0.10 ± 0.02 (диапазон 0.06–0.15) кубических мм (Woyke, 1998). В процессе созревания зародыша вес яйца уменьшается примерно на 30% (DuPraw, 1967; Woyke, 1998), а размер сначала уменьшается, но непосредственно перед вылуплением личинок размер яйца увеличивается. Яйца, которые могут откладываться рабочими пчелами, длиннее, шире, объемнее, тяжелее и более изменчивы по размеру, чем яйца, отложенные маткой (Woyke, 1994; Gençer, Woyke, 2006; Wegener et al., 2010). Это может быть связано с тем, что несколько рабочих пчел откладывают яйца.

Размер яиц отличается у разных подвидов и у маток одного подвида (Taber, Roberts, 1963; Roberts, 1965; Woyke, 1998; Gencer, Woyke, 2006). Он также коррелирует с величиной колонии и условиями жизни пчел – при неблагоприятных условиях размер яиц увеличивается. Более крупные яйца отличаются более высокой выживаемостью, что позволяет предположить, что матки медоносных пчел способны увеличивать размер яиц в неблагоприятных условиях, чтобы повысить выживаемость потомства. Высокая пластичность и генетическая изменчивость размера яиц у медоносных пчел может иметь большое значение для выживания колоний *A. mellifera* (Amiri et al., 2020). Сходный механизм регуляции обнаружен и у плодовой мухи *Drosophila melanogaster*. Особи, выращенные при недостатке пищи, откладывали на 3–6% более тяжелые яйца, чем мухи, выращенные на стандартной пище, несмотря на то, что они были на 30% легче мух с неограниченным питанием (Vijendravarma et al., 2010).

Из более крупных диплоидных яиц развиваются более крупные матки (Гейтманек, 1960) с бóльшим количеством яйцевых трубочек (Бородачева, 1973). Вес яиц также влияет на большинство экстерьерных признаков рабочих пчел, но в меньшей степени, чем пчелиных маток, что, по-видимому, связано с обильным питанием последних на личиночной стадии развития (Бородачева, 1973). Показано различие между диплоидными яйцами, отложенными в ячейки, предназначенных для выращивания рабочих пчел, и яйцами, откладываемыми в ячейки (мисочки) для выращивания маток (Wei et al., 2019). Яйца, отложенные в мисочки на 13.26% тяжелее (157.51 ± 12.37 против 138.93 ± 10.90, мкг), на 2.43% длиннее (1.56 ± 0.04 против 1.52 ± 0.05, мм) и на 4.18% толще (0.374 ± ± 0.010 против 0.359 ± 0.013, мм), чем яйца в пчелиных ячейках (Wei et al., 2019).

Оплодотворение яйцеклетки происходит непосредственно перед откладыванием яйца при прохождении его по яйцеводу. В переднем, расширенном конце яйца находится отверстие (микропиле), через которое из семяприемника матки во время прохождения яйца по яйцеводу проникают спермии. В остальное время микропиле непроницаемо как для бактерий, так и для вирусов. В семяприемнике пчелиной матки сохраняется около 5 миллионов сперматозоидов, полученных во время брачного облета от нескольких трутней. При этом около 60% оплодотворенных яиц получают по одному спермию (Woyke, 1962). Пчеломатка может откладывать как оплодотворенные яйца, из которых формируются женские особи, так и неоплодотворенные – из которых формируются трутни. Оплодотворенные и неоплодотворенные яйца пчелиных маток не различаются по размеру (Henderson, 1992; Gencer, Woyke, 2006). Выделения секрета придаточной железы со сперматозоидами запускается с участием механорецепторов передних ног матки (Koeniger, 1970). Неоплодотворенные яйца, из которых будут развиваться трутни, откладываются в ячейки бóльших размеров, чем предназначенные для рабочих пчел, что и выясняется маткой при ее освидетельствовании очередной ячейки сота.

Яйцо откладывается маткой на донышко восковой ячейки перпендикулярно средостению сота (рабочие пчелы откладывают по несколько яиц на стенку ячейки). В течение трех дней оно постепенно наклоняется и к концу эмбриогенеза ложится на дно ячейки. Через 72 ± 4 ч после откладки яйца его оболочка лопается, и из него выползает личинка.

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ

Отличительной особенностью индивидуального развития медоносной пчелы является стабильность условий, в которых развивается эмбрион, личинка и куколка. Отдельные пчелы являются пойкилотермными животными, но пчелиная семья, как биологическая единица, гомойотермна. В гнезде пчел поддерживается постоянная температура и влажность. В части гнезда пчелиной колонии с разновозрастным расплодом (яйца, личинки, куколки) рабочими пчелами поддерживаются постоянная температура (35°C), влажность (75%) и концентрация углекислого газа (Еськов, 1990). Кондиционирование гнезда обеспечивается рабочими пчелами, но значительное количество тепла выделяется также трутнями и расплодом. Небольшие колебания этих показателей происходят при изменении температуры внешней среды и количества рабочих пчел в колонии (Seeley, 1985). Так при увеличении температуры внешней среды на двадцать градусов начиная с 6°C температура около расплода в центре гнезда почти не менялась – 35.4 ± 0.02°C (Cv = 0.7%), на периферии гнезда – 35.3 ± 0.03°C (Cv = 2%). Увеличение коэффициента вариации (Cv) с 0.7 до 2% показывает, что стабильность температуры в центре гнезда с расплодом выше, чем на периферии. Колебания влажности и содержания углекислого газа в гнезде больше зависят от внешней температуры. Так в зоне расплода концентрация CO_2 при внешней температуре 13.1–17.0°C составляет 0.66 ± 0.024% (Cv = 15.2%), а при 29.1–31.0°C соответственно 0.25 ± 0.012% (Cv = 23.0%) (Еськов, 1990).

В экспериментальных условиях показано, что температура существенно влияет на длительность эмбрионального развития – при понижении температуры с 38 до 30°C длительность зародышевого развития возрастает в 1.66 раза ($P > 0.999$). В данном температурном диапазоне зависимость между температурой (X) и продолжительностью эмбрионального развития (Y) можно выразить уравнением (Еськов, 1995):

$$\mathrm{Y} = 135.63 - 1.71\mathrm{X} + \frac{34.62}{X - 29}.$$

Развитие эмбриона изменяется при резком снижении температуры. Охлаждение яиц до 0°C в течении 1.5 ч вызывает 16 ± 4% гибель. Особенно сильно влияет низкая температура на зародыш в возрасте 8–14 ч (третий–начало четвертого периода), когда происходит образование бластодермы. Действие низкой температуры 8–13°C в этот период в течение 72–135 мин сильно нарушает процесс эмбриогенеза, из зародыша развивается особь, совмещающая признаки трутня и рабочей пчелы. У зародышей в более позднем возрасте меняются только сроки развития, удлиняясь при понижении температуры и сокращаясь при ее повышении. Эмбриональное развитие ускоряется до 66 ч при содержании яиц в термостате при 37–38°C и относительной влажности 75–85%. Понижение температуры до 30–31°C удлиняет период эмбрионального развития до 115 ч (Еськов, 1978).

Выживаемость эмбрионов также связана с температурой: максимальный процент личинок (около 97%) вылупляется при 35°C. Около 96% при 32–33°C, при 36°C – 92%, при 30°C – 85%, при 38°C – 52%, при 29°C – 5%.

Не обнаружены достоверные различия между гаплоидными и диплоидными эмбрионами по продолжительности развития в зависимости от температуры (Еськов, 1995). При 30°C гаплоидные эмбрионы развиваются в течение 114 ч (Cv = 6%), а диплоидные – 116 ч (Cv = 15%). Соответственно, при 34°C – 80 ч (Cv = 3%) и 79 ч (Cv = 4%), при 38°C – 69 ч (Cv = 3%) и 70 ч (Cv = 5%).

Наибольшее количество личинок (95.5%) вылупляется из яиц при 75 ± 2% влажности. С повышением и понижением влажности процент гибели развивающихся эмбрионов возрастает. Влажность ниже 45 ± 2% приводит к 100% гибели эмбрионов. При 50–55% – выживаемость около 60% (Еськов, 1978).

Важный фактор, который может повлиять на эмбриогенез медоносной пчелы – освещенность. В норме гнездо защищено от попадания естественного освещения. Облучение яиц светом различной длины волны и временем экспозиции поразному влияет на эмбриогенез. Так одноминутное облучение солнечным светом (освещенность $9.4 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$ лк) увеличивает элиминацию в 1.5 раз (контроль 3.6±2.4%), трехминутное – в 4.2 раза, пятиминутное – в 7.4 раза, семиминутное – в 15.3 раза, десятиминутное – в 18.7 раза и двадцатиминутное – в 22.7 раза (Еськов, 1995). Ультрафиолетовое облучение (360 нм) интенсифицирует элиминацию яиц пчелами: контроль (без облучения) – 5.6 ± 3.6%, 1 с – увеличение элиминации в 1.1 раза, 3 с – в 3.0 раза, 5 с – в 12.4 раза, 10 с – в 17.1 раза (Еськов и др., 1991; Еськов, Чельцов, 1992).

Облучение яиц в сотах на стадии четвертого – пятого периода эмбриогенеза (30 ± 6 ч) синим светом (синий светодиод 0.6 мКд), модулированным низкой частотой 50, 500, 2000 или 20000 Гц, в течение 5–30 мин на расстоянии 10–50 см (20 мин – 10 см – 50 Гц; 1 мин – 20 см – 500 Гц; 30 мин – 50 см – 2000 Гц; 5 мин – 30 см – 20000 Гц) сокращает на трое суток продолжительность развития рабочих пчел до имаго (с 21 до 18 сут) (Егоров и др., 2010).

В настоящее время в естественных условиях обитания пчел на их развитие может оказывать влияние электромагнитное загрязнение. Электрическое поле 50 Гц при напряженности 10–20 кВ/м незначительно увеличивает удаление пчелами яиц: при 24 ч воздействии элиминация составляет 6.4%, в контроле – 5.9% (Еськов, 1995). Длительное воздействие низкочастотного электрического поля 50 Гц при напряженности 12–20 кВ/м на колонию пчел нарушает внутригнездовую терморегуляцию и повышает температуру в зоне расплода до 38.2 ± 2°C (Еськов, Тобоев, 2008), что укорачивает длительность эмбриогенеза.

ООФАГИЯ – МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Если на личиночной стадии онтогенеза пчелы важнейший механизм управления направлением развития – это специфическое питание личинки, которое используют рабочие пчелы, то на эмбриональной стадии важный фактор социального контроля – выбраковка, элиминация яйца посредством его поедания. Этот механизм носит название оофагии и является одним из проявлений каннибализма в колониях социальных видов насекомых (Stark et al., 1990). Оофагия происходит на разных уровнях. Во-первых, это поедание яйцекладущими самками кладок других самок (Лопатин, Ишмуратова, 2010). У *Xylocopa sulcatipes* (пчела-плотник) многократная взаимная оофагия происходит в период формирования полигинно основанной колонии (Stark et al., 1990), когда устанавливается иерархия доминирования между самками. Схожее поведение обнаружено также в гнездах пчел *Euglossa fimbriata* (Augusto, Garófalo, 2009). В колониях эусоциальных ос семейства Настоящие осы также обнаружено и распознавание яиц, и дифференциальная оофагия (Dapporto et al., 2010). В использовании такого метода ревизии предполагается ключевое участие ювенильного гормона, как метки яиц доминантной самки (Oi et al., 2020).

Во-вторых, это поедание рабочими пчелами яиц, отложенных другими рабочими особями (пчелами-трутовками). У близкородственного *A. mellifera* вида – восточной медоносной пчелы (*Apis cerana*) – до 11.7% рабочих особей откладывают яйца, но они редко доживают до окукливания из-за интенсивной ревизии – распознавания рабочими пчелами таких яиц (egg policing) и личинок (Holmes et al., 2014). Матка медоносных пчел при откладке яиц предположительно помечает их секретом Дюфуровой железы и старается не пропускать ячейки сота (количество пустых ячеек служит индикатором качества матки). Яйца с “неправильной” меткой рабочие пчелы съедают, выявляя их с помощью антенн. Пчелы, возможно, не могут идентифицировать мертвые эмбрионы (яйца), поскольку они не удаляются (Martin et al., 2004; Beekman, Oldroyd 2005; Kärcher, Ratnieks, 2014). Это говорит о том, что не жизнеспособность как таковая используется как сигнал для удаления яйца.

Яйца, отложенные маткой, и яйцекладущими рабочими пчелами покрыты различными пептидами. Количество типов пептидов больше на яйцах, отложенных рабочими пчелами. В основном это пептиды входящие в состав пчелиного яда (в том числе мелиттин), их было в 10.3 раза больше, чем на яйцах, откладываемых матками. На яйцах маток в 11.0 раз больше пептидов, производных сериновой протеазы, чем на яйцах пчел (Ernst, 2016). Механизм химической маркировки яиц пока полностью не изучен (Martin et al., 2004, 2018).

У медоносных пчел оофагия кроме того встречается при недостатке в гнезде пыльцы (перги) — источника аминокислот для пчел, и может доходить в таких случаях до 90% всех отложенных маткой яиц (Кашковский, Машинская, 1989; Schmickl, Crailsheim, 2001).

У пчел возможна полиспермия и гинандроморфизм (Aamidor et al., 2018), когда при оплодотворении в яйце происходит слияние не только сперматозоида и яйцеклетки, но и других спермиев с редукционными тельцами. Гинандроморфы сочетают в себе морфологические признаки рабочей пчелы и трутня. Описан также пока единственный случай появления жизнеспособной пчелы, несущей лишь отцовский геном от двух трутней (Aamidor et al., 2018). Рождение таких особей в пчелиной семье, по-видимому, возможно лишь при нарушении распознавания пчелами яиц с необычным геномом (egg policing) и последующей оофагией.

ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ ООЦИТОВ *A. MELLIFERA*

У медоносных пчел гаплодиплоидный тип определения пола (Dzierzon, 1845) — яйца, содержащие 16 хромосом, дают мужских особей (арренотокия (arrhenotoky) или арренотокный партеногенез). При 32 хромосомах в яйце, появляется женская особь — или рабочая пчела, или матка, что регулируется рабочими пчелами через механизм управления питанием в личиночный период. В случае гибели единственной пчеломатки структура колонии может быть восстановлена, если в семье еще сохранились диплоидные яйца или личинки до трехдневного возраста. В этот период рабочими пчелами может быть решена задача изменения траектории развития в направлении формирования пчелиной матки (Seeley, 1995). В противном случае часть рабочих пчел через 20–35 дней начинают откладку гаплоидных яиц, дающих начало мужским особям — трутням (Miller, Ratnieks, 2001). В отдельных случаях рабочие особи также способны откладывать диплоидные яйца (телитокия (thelytoky) — вид партеногенеза, при котором самки без оплодотворения производят самок). Таким образом, обе женские касты (матки и рабочие пчелы) способны откладывать как диплоидные, так и гаплоидные яйца, но только диплоидные яйца пчелиной матки оплодотворены сперматозоидами трутней, остальные яйца — партеногенетические. Не спарившиеся с трутнями матки способны откладывать лишь неоплодотворенные яйца, но в редких случаях возможен партеногенетический процесс — телитокия. Отсутствие оплодотворенных яиц ведет к вырождению семьи. Но исследование механизмов партеногенеза у пчел, возможно, позволит получать инбредные линии для закрепления эффекта гетерозиса с целью повышения продуктивности пчелосемей (Астауров, 1977).

Интересные, незаслуженно забытые эксперименты по искусственному партеногенезу в яйцах, отложенных пчелиными матками, проводила в семидесятых годах Виктория Владимировна Тряско — первооткрыватель полиандрии у медоносных пчел. Результаты были доложены на XXV конгрессе Апимондии (XXV Апимондия, 1975; Тряско, 1980), но не привлекли внимания, так как значительно опережали свое время. Тема телитокии у медоносных пчел станет популярной лишь через 17 лет после так называемого “Капского бедствия” 1992 года, когда более ста тысяч пчелосемей *Apis mellifera scutellata* были уничтожены псевдоматками *Apis mellifera capensis* (Martin et al., 2002). Подвид медоносных пчел *Apis mellifera capensis* склонен к социальному паразитизму — рабочие пчелы иногда проникают в колонии *Apis mellifera scutellata* и откладывают диплоидные яйца (телитокия), что связано с делецией 9 пар нуклеотидов во фланкирующем интроне ниже пятого экзона гена *gemini* и изменением экспрессии 471 гена (Aumer et al., 2018). Аутомиктический партеногенез *Apis mellifera capensis* сводится к возникновению двуядерных яиц, второе ядро которых развивается из дистального производного деления первого направительного тельца.

Тряско индуцировала апомиктический партеногенез в гаплоидных яйцах, которые матка всегда откладывает вне пчелиных ячеек. Яйца активировались теплом или холодом и после инкубации (90–120 мин) их фиксировали (спирт–уксус 3 : 1), окрашивали ацетокармином и проверяли под микроскопом, произошло ли деление созревания. Успех термоактивации оценивали по проценту яиц с одним делением. Он был достаточно высок (35–89%) у яиц отдельных маток, в большинстве же яиц эффект отсутствовал. Причина этого в том, что судьба ядра ооцита определяется развитием окружающей цитоплазмы. Незрелая ооплазма меняет характер делений созревания и проявляет неспособность элиминировать лишние пронуклеусы (Тряско, 1980).

ХРОНОБИОЛОГИЯ ЯЙЦЕКЛАДКИ И ЭМБРИОГЕНЕЗА ПЧЕЛ

Плодовая муха *Drosophila melanogaster* была первым организмом, у которого обнаружили гены, регулирующие циркадные ритмы. Откладка яиц *Drosophila* также находится под циркадианным контролем (Allemand, 1977; Howlader, Sharma, 2006; Manjunatha et al., 2008). Яйцекладка у самок мух происходит ритмично, начиная с середины дня и достигая максимума к вечеру (McCabe, Birley, 1998; Sheeba et al., 2001; Manjunatha et al., 2008). У медоносных пчел матка играет важную роль в синхронизации циркадных ритмов колоний (Moritz, Sakofski, 1991). Что же касается суточных циркадных ритмов, то матки пчел демонстрируют циркадную пластичность в своем поведении при изоляции на одном из сотов (Harano et al., 2007). Трехчасовая периодичность замера яйцекладки выявляет ритмическую структуру суточного хода откладки яиц маткой. В ней четко выделяются этапы нарастания яйцекладки в течение 12 ч с минимального суточного значения в 17 ч до максимума в 5 ч, затем идет снижение интенсивности яйцекладки до минимального в 17 ч. Этот эффект не зависит от количества принесенного в колонию пчелами пыльцы и нектара (Загретдинов, 2008). Дальнейшие исследования показали шестичасовые колебания уровня яйцекладки с меньшей амплитудой (Загретдинов, 2009). В естественных условиях без изоляции матки наблюдалось аритмичное откладывание яиц (Free et al., 1992; Johnson, 2010).

Длительность одного минимального митотического цикла в период синхронных делений ядер (τ_0 по Детлаф, 1995) у медоносной пчелы равна 30–35 мин. Учитывая, что эмбриогенез длится около 72 ч (τ_n), общая продолжительность развития зародыша в безразмерных единицах (τ_n/τ_0) будет равна 140, столько же, сколько и у *D. melanogaster* (Детлаф, 2001). Это говорит о сходстве временных закономерностей эмбриогенеза *D. melanogaster* и *A. mellifera*, хотя у пчел гаструляция начинается позднее, чем у *D. melanogaster*. Использование безразмерных критериев для характеристики возраста зародышей, таких как τ_0, может быть полезно как при изучении эмбриогенеза медоносных пчел, так и при изучении эволюции эмбриогенеза в надсемействе Пчелиные (Apoidea), в связи с эволюцией социальности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пчелы – удобная модель биологии развития, с хорошо аннотированным геномом и детально изученными стадиями эмбриогенеза. Медоносная пчела как объект эмбриологии имеет множество преимуществ перед другими модельными организмами: возможность получения большого количества яиц, простота инкубирования эмбрионов, хорошо описанные методы работы с яйцами медоносных пчел. Эмбриогенез пчелы имеет как сходства, так и отличия от эмбрионального развития дрозофилы и заканчивается на менее зрелой стадии вылупления. Представители отряда Перепончатокрылые (Hymenoptera) предположительно появились на Земле около 350 млн лет назад, Двукрылые (Diptera) произошли около 160 млн лет назад (Misof et al., 2014). У медоносных пчел несколько вариантов партеногенетического развития ооцита, что также нетипично для большинства насекомых.

Значительное влияние на эмбриологию медоносных пчел оказывает их социальное поведение – поддержание постоянной температуры и влажности, ревизия яиц и оофагия, регуляция яйцекладки матки и размера яиц. Это существенно отличает эмбриологию пчел от других насекомых. Изучение эмбриогенеза отдельных видов насекомых важно для понимания их эволюции, в том числе эволюции социальности. Среди всего многообразия насекомых существует лишь одна группа, в которой представлены все известные типы социальной организации – надсемейство Пчелиные (Apoidea). Наивысшей социальной организацией среди пчел обладают колонии медоносной пчелы (*A. mellifera*). Эволюция социальности – один из важнейших и интереснейших разделов социобиологии – науки о биологических основах социального поведения и социальной организации у животных и человека. Глубокое исследование эмбриологии пчел не только прольет свет на происхождение и развитие эусоциальности, но и позволит значительно повысить выживаемость и продуктивность этих самых важных для человека насекомых.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, № 0108-2019-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Астауров Б.Л. Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. М.: Наука, 1977. 343 с.

Бородачева В.Т. Масса яиц и качество маток и пчел // Пчеловодство. 1973. № 9. С. 12–13.

Гейтманек Я. О разнообразности пчелиных яиц // Сельскохозяйственная литература Чехословакии. Реферативный журн. Прага. 1960. С. 96.

Детлаф Т.А. Безразмерные критерии развития зародышей, личинок и куколок дрозофилы и зародышей пчелы в таблицах нормального развития // Онтогенез. 1995. Т. 26. № 2. С. 125–131.

Детлаф Т.А. Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001. С. 143–150.

Егоров В.В., Козин Р.Б., Королев А.В. Способ стимуляции эмбриогенеза пчел // Патент RU2395959C2. 2010.

Еськов Е.К. Микроклимат пчелиного улья и его регулирование. М.: Россельхозиздат, 1978. С. 46–47.

Еськов Е.К. Экология медоносной пчелы. М.: Росагропромиздат, 1990. 221 с.

Еськов Е.К. Экология медоносной пчелы. Рязань: Русское слово, 1995. 394 с.

Еськов Е.К., Тобоев В.А. Воздействие искусственно генерируемых электромагнитных полей на биологические объекты // Вестник Чувашского университета. 2008. № 2. С. 28–36.

Еськов Е.К., Чельцов В.Н., Хрусталева Н.В. Влияние искусственного ультрафиолетового облучения на жизнеспособность и морфогенез развивающихся рабочих пчел // Деп. в ВИНИТИ. Рязань, 1991. № 4633-В91.

Еськов Е.К., Чельцов В.Н. Устойчивость развивающихся пчел к ультрафиолетовому облучению // Деп. в ВИНИТИ. Рязань, 1992. № 1332-В92.

Загретдинов А.Ф. Временная организация процесса яйцекладки маткой // Пчеловодство. 2008. № 6. С. 18–20.

Загретдинов А.Ф. Биоритмы яйцекладки пчелиной матки в зависимости от видов медосбора, породы пчел и отбора пыльцы в течении трех суток // Аграрный вестник Урала. 2009. № 10(64). С. 89–91.

Кашковский В.Г., Машинская Н.Д. О каннибализме медоносных пчел // Пчеловодство. 1989. № 8. С. 10–13.

Лопатин А.В., Ишмуратова Н.М. Синтетические аналоги низкомолекулярных биорегуляторов медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в разведении земляного шмеля *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) // Труды Русского энтомологического общества. С.-Петербург. 2010. Т. 80(4). С. 188–195.

Монахова М.А. (ред.) Пчела медоносная (*Apis mellifera*) в генетическом поле. Эколого-генетические характеристики. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2019. 154 с.

Тряско В.В. Признаки осемененности пчелиных маток // Пчеловодство. 1951. № 11. С. 25–31.

Тряско В.В. Женский партеногенез медоносной пчелы // Пчеловодство. 1980. № 4. С. 13–14.

Aamidor Sarah E., Yagound Boris, Ronai Isobel et al. Sex mosaics in the honeybee: how haplodiploidy makes possible the evolution of novel forms of reproduction in social Hymenoptera // Biology Letters. 2018. Nov. 28. V. 14. № 11. P. 20180670.

Al-Kahtani S.N., Wegener J., Bienefeld K. Variability of prenatal maternal investment in the honey bee (*Apis mellifera*) // J. Entomology. 2013. № 10. P. 35–42.

Allemand R. Influence de l'intensité d'éclairement sur l'expression du rythme journalier d'oviposition de *Drosophila melanogaster* en conditions lumineuses LD 12:12 // Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences. Paris. 1977. Ser. D. № 284. P. 1553–1556.

Amiri E., Le K., Melendez CV. et al. Egg-size plasticity in Apis mellifera: Honey bee queens alter egg size in response to both genetic and environmental factors // J. Evolutionary Biology. 2020. Jan. 21.

Augusto S., Garófalo C. Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini) // Genetics and Molecular Research. 2009. May 12. V. 8. № 2. P. 525–538.

Bütschli O. Zur Entwicklungsgeschichte der Biene // Zeit. Wis-sensch. Zool. 1870. № 19. P. 519–564.

Cridge A.G., Lovegrove M.R., Skelly J.G. et al. The honeybee as a model insect for developmental genetics // Genesis. 2017. May. V. 55. № 5.

Cruz-Landim Carminda. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

Dapporto L., Bruschini C., Cervo R. et al. Hydrocarbon rank signatures correlate with differential oophagy and dominance behaviour in *Polistes dominulus foundresses* // J. Experimental Biology. 2010. Feb 1. V. 213. № 3. P. 453–458.

DuPraw E.J. Research on the honey bee egg // Gleanings in Bee Culture. 1960. № 88. P. 104–111.

DuPraw E.J. The honeybee embryo. // Methods in Developmental Biology / Eds. Wilt F., Wessels N. Crowell Press, N.Y. 1967. P. 183–217.

Dzierżon Jan. Bienenzeitung. 1845. № 1. P. 111.

Ernst U. The Honeybee as a Model to Study Worker Policing, Epigenetics, and Ageing. KU Leuven, Science, Engineering & Technology, 2016. 208 p.

Free J.B., Ferguson A.W., Simpkins J.R. The behavior of queen honeybees and their attendants // Physiological Entomology. 1992. № 17. P. 43–55.

Gencer H.V., Woyke J. Eggs from *Apis mellifera caucasica* laying workers are larger than from queens // J. Apicultural Research. 2006. № 45. P. 173–179.

Harano K., Sasaki M., Sasaki K. Effects of reproductive state on rhythmicity, locomotor activity and body weight in the European honeybee, *Apis mellifera* queens (Hymenoptera, Apini) // Sociobiology. 2007. № 50. P. 189–200.

Henderson C.E. Variability in the size of emerging drones and of drone and worker eggs in honey bee (*Apis mellifera*) colonies // J. Apicultural Research. 1992. № 31. P. 114–118.

Holmes M.J., Tan K., Wang Z. et al. Why acquiesce? Worker reproductive parasitism in the Eastern honeybee (*Apis cerana*) // J. Evolutionary Biology. 2014. May. V. 27. № 5. P. 939–949.

Howlader Gitanjali, Sharma Vijay Kumar. Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiology. 2006. V. 52. № 8. P. 779–785.

Johnson Jennifer N. Lack of rhythmicity in the honey bee queen: An investigation of temporal behavioral patterns in *Apis mellifera ligustica* // Electronic Theses and Dissertations. 2010. 1751.

Jordan R. Über die beziehung der Eigrosse zum Umfang der Eiablage // Bienenvater. 1961. V. 82. № 5. P. 132–134.

Koeniger N. Über die fähigkeit der bienenkonigin (*Apis mellifica* L.) zwischen arbeiterinnen-und drohnenzellen zu unterscheiden // Apidologie (Celle). 1970. № 1. P. 115–142.

Manjunatha T., Dass Shantala Hari, Sharma Vijay Kumar. Egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster* // J. Genetics. 2008. V. 87. P. 495–504.

Martin S.J., Beekman M., Wossler T.C. et al. Parasitic Cape honeybee workers, *Apis mellifera capensis*, evade policing // Nature. 2002. Jan. 10. V. 415(6868). P. 163–165.

Martin Stephen J., Jones Graeme R. Conservation of Bio synthetic pheromone pathways in honeybees Apis // Naturwissenschaften. 2004. May. V. 91. № 5. P. 232–236.

Martin S.J., Correia-Oliveira M.E., Shemilt S. et al. Is the salivary gland associated with honey bee recognition compounds in worker honey bees (*Apis mellifera*)? // J. Chem. Ecol. 2018. Aug. V. 44. № 7–8. P. 650–657.

McCabe C., Birley A. Oviposition in the period genotypes of *Drosophila melanogaster* // Chronobiol. Int. 1998. Mar. V. 15. № 2. P. 119–133.

Miller D.G., Ratnieks F.L.W. The timing of worker reproduction and breakdown of policing behaviour in queenless honey bee (*Apis mellifera* L.) societies // Insectes Soc. 2001. № 48. P. 178–184.

Misof B., Liu S., Meusemann K. et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution // Science. 2014. Nov. 7. № 346(6210). P. 763–767.

Moritz Robin F.A., Sakofski Fritz. The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.) // Behav. Ecol. Sociobiol. 1991. № 29. P. 361–365.

Nelson J.A. The Embryology of the Honey Bee. Princeton Univ. Press, 1915. 316 p.

Nolan W.J. Do daily egg-laying rates of less than 3000 found by recent investigators indicate average queenbees? // J. Economic Entomology. 1927. V. 20. № 3. P. 501–507.

Oi Cintia Akemi, Brown Robert L., da Silva Rafael Carvalho et al. Reproduction and signals regulating worker policing under identical hormonal control in social wasps // Scientific Reports. 2020. Nov. 4. V. 10. № 1. P. 18971.

Roberts W.C., Taber S. Egg-weight variance in honey bees // Annals of the Entomological Society of America. 1965. № 58. P. 303–306.

Schnetter M. Morphologische untersuchungen über das differenzierungszentrum in der embryonal-entwicklung der honigbiene // Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. 1934. № 29. P. 114–195.

Seeley T.D. Honeybee Ecology: A Study of Adaptation in Social Life (Monographs in Behavior and Ecology). 1985. 212 p.

Seeley T.D. The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies. 1995. 295 p.

Schmickl T., Crailsheim K. Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages // J. Comp. Physiol. A. 2001. Sep. V. 187. № 7. P. 541–547.

Sheeba V., Chandrashekaran M.K., Joshi A. et al. Persistence of oviposition rhythm in individuals of *Drosophila melanogaster* reared in an aperiodic environment for several hundred generations // J. Exp. Zool. 2001. Sep. 15. V. 290. № 5. P. 541–549.

Sieber K., Dorman T., Newell N. et al. (Epi) genetic mechanisms underlying the evolutionary success of eusocial insects // Insects. 2021. May 27. V. 12. № 6. P. 498.

Stark R.E., Hefetz A., Gerling D. et al. Reproductive competition involving oophagy in the socially nesting bee *Xylocopa sulcatipes* // Naturwissenschaften. 1990. V. 77. № 1. P. 38–40.

Taber S., Roberts W.C. Egg weight variability and its inheritance in the honey bee // Annals of the Entomological Society of America. 1963. № 56. P. 473–476.

Vijendravarma R.K., Narasimha S., Kawecki T.J. Effects of parental larval diet on egg size and offspring traits in *Drosophila* // Biology Letters. 2010. V. 6. № 2.

Wei H., He X., Liao C. et al. A maternal effect on queen production in honeybees // Current Biology. 2019. Jul. 8. V. 29. № 13. P. 2208–2213.

Wegener J., Lorenz M.W., Bienefeld K. Differences between queen- and worker-laid male eggs of the honey bee (*Apis mellifera*) // Apidologie. 2010. V. 41. № 1. P. 116–126.

Woyke J. Comparison of the size of eggs from *Apis mellifera* L. queens and laying workers // Apidologie. 1994. № 25. P. 179–187.

Woyke J. Size change of *Apis mellifera* eggs during the incubation period // Journal of Apicultural Research. 1998. № 37. P. 239–246.

Zeid A.S. Antennal sensilla of the queen, half-queen and worker of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera lamarckii* // J. Apicultural Research January. 2001. V. 40. № 2. P. 53–58.

Zeid A.S. Comparison of eggs produced by queens, halfqueens and worker bees and weight ofemerging workers in *Apis mellifera lamarckii* // J. Apicultural Research. 2020. 04 Jun. P. 685–690.

XXV международный конгресс по пчеловодству Гренобль–Франция 8–14 сентября 1975 // Апимондия. Бухарест. 1975.

The Role of External Factors in the Embryogenesis of *Apis mellifera*

D. V. Boguslavsky[1,*] and I. S. Zakharov[1]

[1]Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilov 26, Moscow, 119334 Russia
**e-mail: boguslavsky@rambler.ru*

The embryonic development of honeybees has been studied for more than 150 years (Bütschli, 1870) and a lot of data have been accumulated on the embryogenesis of *Apis mellifera* L., but in modern insect embryology, bees are still little used as an object of research. In addition to the importance of bees as pollinators and producers of biologically active substances, the participation of social behavior in controlling the course of individual development of these hymenopterans is of great interest. This review provides information on external factors (biotic and abiotic) affecting the embryogenesis of *A. mellifera*, including those associated with social behavior.

Keywords: honey bee, embryogenesis, queen honey bee, laying workers, parthenogenesis, polyandry, oophagy, egg policing, *Apis mellifera*

ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 6, с. 485–504

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 57.017.35;576.32.36;577.29;57.086.833;617.7

РОЛЬ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В КОНТРОЛЕ ГИСТОГЕНЕЗА, ГОМЕОСТАЗА И ПАТОГЕНЕЗА СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2021 г. Ю. В. Маркитантова[a], *, В. Н. Симирский[a], **

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

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

**e-mail: simir@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2021 г.
После доработки 26.07.2021 г.
Принята к публикации 30.07.2021 г.

Пуринергическая сигнальная система (ПСС) занимает особое место в регуляции клеточных процессов, поддержании гомеостаза сетчатки глаза позвоночных. В функционировании ПСС в сетчатке, помимо общих закономерностей, проявляются таксоноспецифические различия, генетически и метаболически обусловленные. Сигнальные каскады с участием компонентов ПСС могут выполнять в сетчатке двойственную роль: оказывая как повреждающее, так и защитное действие, что во многом определяется условиями клеточного микроокружения и молекулярного контекста. Выявление ключевых звеньев в работе ПСС, связывающих ее с другими эндогенными регуляторными системами, создает предпосылки для выбора клеточных и молекулярных мишеней для нейропротекции при патологиях сетчатки глаза у человека.

Ключевые слова: сетчатка, ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), дифференцировка, пролиферация, пуринергическая сигнальная система, сигнальные пути, нейродегенерация, нейропротекция

DOI: 10.31857/S0475145021060082

ВВЕДЕНИЕ

Пуринергическая сигнальная система (ПСС) вовлечена в регуляцию основных физиологических и патологических процессов в организме и находится в ряду приоритетных тематик биомедицины. Пурины являются триггерами и модуляторами клеточных процессов (пролиферации, дифференцировки, миграции, гибели клеток) и вовлечены в сигнальные пути нейротрансмиссии, поддержание гомеостаза нейральных тканей в эмбриогенезе и постнатальном периоде развития (Burnstock, Knight, 2004; Lin et al., 2006; Burnstock, Ulrich, 2011). За длительную историю исследований накоплен большой объем данных о разных аспектах участия компонентов ПСС в сетчатке глаза позвоночных (Sholl-Franco etal., 2010; Kur, Newman, 2013). В сетчатке ПСС играет важную роль в обеспечении взаимодействий между клетками пограничных тканей: фоторецепторами, ретинальным пигментным эпителием (РПЭ), клетками сосудов и глии, что является условием их функционирования (Mitchell, Reigada, 2008; Ventura et al., 2019). Взаимодействия перицитов эндотелия капилляров сетчатки и клеток РПЭ, мембраны Бруха, хориокапилляров, а также глии, обеспечивают целостность гематоретинального барьера и поддержание микросреды клеток сетчатки (Cunha-Vaz et al., 2011). ПСС играет существенную роль в этих процессах (Nagase et al., 2006). Взаимодействия между нейронами и клетками глии сетчатки, в контексте ПСС, при метаболических нарушениях, сопровождающихся нейродегенеративными процессами, отражены в ряде обзоров (Ward et al., 2010; Guzman-Aranguez et al., 2014; Sanderson et al., 2014; Reichenbach, Bringmann, 2016; Sinha et al., 2020a).

Ключевая роль в работе ПСС принадлежит аденозинтрифосфату (АТФ) и метаболитам, которые высвобождаются во внеклеточное пространство практически всеми клетками. РПЭ (Pearson et al., 2005), глия Мюллера, астроциты, амакриновые и ганглиозные нейроны (Vecino et al., 2016) служат источником АТФ, высвобождаемого под действием разных стимулов (свет, KCl-агонисты деполяризации клеток, глутамат, кальций) (Cunha-Vaz et al., 2011). Одна из основных функций АТФ сводится к пространственно-временной организации процессов эмбрионального развития (Dale, 2008; Burnstock, Ulrich, 2011). С помощью биосенсоров, высвобождение АТФ было зарегистрировано в клетках передней части нервной пластинки задолго до начала регионализации области формирования глаза в ходе эмбрионального развития шпорцевой лягушки. Выявлено участие компонентов ПСС — эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаз (ENTPD) — в конвертации АТФ в АДФ и АМФ, создании морфогенетических концентрационных градиентов, которые могут оказывать влияние на экспрессию регуляторных генов “глазного поля”. Это влияние осуществляется посредством специфического набора пуринорецепторов (Masse, Dale, 2012), которые, как известно, принадлежат к числу одних из первых мембранных рецепторов функционально активных в раннем эмбриогенезе (Schacher et al., 1997; Burnstock, 2007; Verkhratsky, Burnstock, 2014).

Представления о тканеспецифическом распределении и роли компонентов ПСС, их связи с другими сигнальными путями и генами-мишенями в нейральных тканях глаза в ходе онтогенеза позвоночных постоянно обогащаются. В настоящем обзоре обсуждается роль ПСС в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток сетчатки глаза позвоночных, на базе анализа данных, полученных с использованием современных подходов, на модельных объектах *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрены современные стратегии фармакологической нейропротекции, основанные на использовании компонентов ПСС, которые нашли применение при лечении патологий глаза, сопровождающихся нейродегенеративными процессами.

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О КЛЮЧЕВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В СЕТЧАТКЕ

ПСС является частью более обширной системы, называемой пуриномом, которая объединяет множество белков, утилизирующих, связывающих и транспортирующих пурины (пуринорецепторы, G-белки, АТФазы, протеинкиназы, дегидрогеназы, эктонуклеотидазы, транспортеры), и кофакторы (Yegutkin, 2008; Sanderson et al., 2014; Giuliani et al., 2019). Пуриновые агонисты активируют трансмембранные пуринорецепторы, участвуя как в обеспечении быстрых реакций (нейротрансмиссия, нейромодуляция, секреция), так и длительных (трофических) клеточных процессов (пролиферация, дифференцировка, миграция, гибель клеток) в развитии и регенерации тканей (Abbracchio et al., 2009). В клетках большинства эукариот АТФ синтезируется в цитозоле посредством гликолиза, и в митохондриях путем окислительного фосфорилирования. В условиях *in vivo* АТФ быстро распадается в несколько этапов до аденозина и фосфатов, для которых существует механизм обратного захвата в нервную клетку (Zimmermann et al., 2012). АТФ и метаболиты (АДФ, АМФ, аденозин) высвобождаются во внеклеточное пространство с помощью АТФ-связывающих кассетных транспортеров (Quazi, Molday, 2014; Locher, 2016), через хемиканалы (коннексины, паннексины) (Baroja-Mazo et al., 2013), через хлоридные каналы чувствительные к изменениям объема клеток, посредством экзоцитоза лизосом, через пуринорецепторы (P2XR) (Lazarowski et al., 2011; Jung et al., 2014).

Пуриновые рецепторы. Известны два основных класса пуриновых рецепторов: аденозиновые P1-рецепторы, универсальным агонистом которых является аденозин, и P2-рецепторы, универсальным агонистом которых служит АТФ (для некоторых рецепторов — АДФ). Идентифицированы четыре подтипа P1-рецепторов к аденозину: A1R, A2AR, A2BR и A3R. A1R и A3R образуют комплексы с Gαi семейством G-белков, а A2AR и A2BR — с Gαs-белками, которые обеспечивают сопряжение этих рецепторов с аденилатциклазой. P2-рецепторы включают два больших подсемейства: лиганд-оперирующие ионотропные рецепторы P2XR и метаботропные рецепторы P2YR, связанные с G-белком. Известны семь подтипов P2X-рецепторов (P2X1–7) и восемь подтипов P2Y-рецепторов (P2Y1, 2, 4, 6, 11–14). АТФ может действовать как через рецепторы P2XR, так и через рецепторы P2YR, в то время как аденозин проявляет селективность к метаботропным аденозиновым (AR) рецепторам (Jacobson, Muller, 2016).

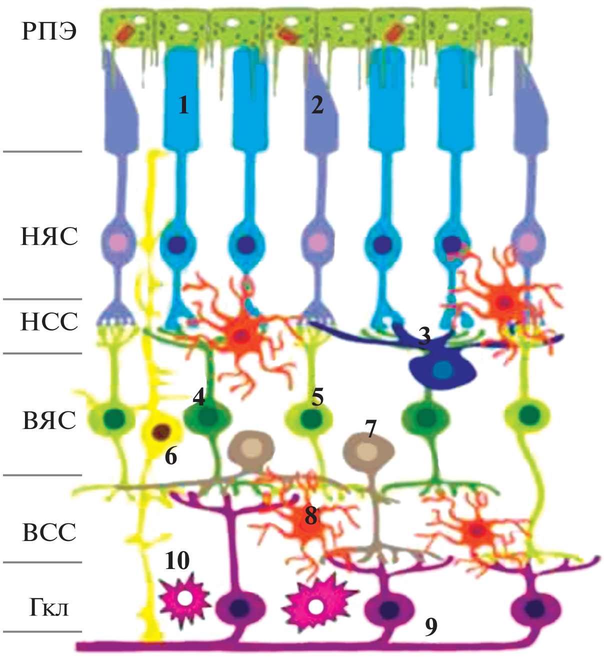
Эктонуклеотидазы. Внеклеточные уровни АТФ и продуктов его гидролиза регулируются эктонуклеотидазами, которые являются важным звеном в пуринергических сигнальных каскадах (Zimmermann et al., 2012). Высвобождаемый из клеток АТФ последовательно дефосфорилируется в АДФ, АМФ и аденозин с помощью эктонуклеотидаз и экто-АТФаз, которые связаны с плазматической мембраной и характеризуются тканеспецифичностью экспрессии. Эктоэнзимы участвуют в создании градиента продуктов метаболизма АТФ, от их активности зависит метаболизм АТФ, регуляция пространственного распределения и связывание лигандов (АДФ, АМФ, аденозина) с соответствующими пуриновыми рецепторами (Burnstock, Knight, 2004; Alvarado-Castillo et al., 2005). В тканях глаза позвоночных идентифицированы четыре основных семейства эктонуклеотидаз: эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы (ENTPD, также известные как CD39), экто-5'-нуклеотидаза (eN или CD73), эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPPs) и щелочные фосфатазы (ALPs). Эктоэнзимы ENTPD 1, 2, 3 и пуринорецепторы P2XR, P2YR выявлены на самых ранних стадиях эмбриогенеза практически у всех позвоночных и вовлечены в формирование тканей-производных зародышевых листков (эктодермы, мезодермы, эндодермы) (Dale, 2008; Burnstock, Ulrich, 2011). Функции ENTPD 2 в тканях заднего сектора глаза связаны с поддержанием баланса аденозина, регуляцией гематоретинального барьера, пролиферацией клеток, обеспечением нормального функционирования глаза (Lu et al., 2015).

Нуклеотидные и нуклеозидные транспортеры. Адениновые нуклеотиды транспортируются в другие клеточные компартменты носителями митохондриальных АДФ/АТФ и АМФ/АТФ (Traba et al., 2011). Идентифицированы два типа транспортеров, которые переносят нуклеозиды через плазматическую мембрану клетки и мембраны клеточных органелл: концентрационные нуклеозидные транспортеры (CNT) (Na^+-зависимые симпортеры) и равновесные нуклеозидные транспортеры (ENT) (Na^+-независимые пассивные носители) (King et al., 2006; Akanuma et al., 2013).

Транспортеры ABC. АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ABC) включают в себя суперсемейство белков, обнаруженных практически во всех живых организмах. Они состоят из четырех основных доменов: двух трансмембранных доменов (ТМД) и двух доменов, связывающих нуклеотиды (НСД) (Ahn, Molday, 2000). Эти транспортеры переносят, как правило, широкий спектр соединений через клеточные мембраны, используя гидролиз АТФ в качестве источника энергии. Субстраты, о которых известно, что они транспортируются различными транспортерами ABC, включают фосфолипиды, жирные кислоты, стероиды, органические анионы, ионы металлов, лекарственные препараты, аминокислоты, пептиды, витамины и другие соединения (Kim et al., 2008). ABC-транспортеры эукариот являются однонаправленными экспортерами, переносящими субстраты со стороны цитоплазмы на внеклеточную сторону плазматической мембраны или в просвет внутриклеточных мембран (Tsybovsky et al., 2010). ABC-транспортеры ответственны за обеспечивание гематоэнцефалического барьера, участвуя в механизме межклеточного транспорта субстратов, лекарственных препаратов, и способствуют поддержанию гомеостаза в нейральных тканях. В сетчатке млекопитающих в гиалоидных сосудах выявлены транспортеры P-gp/ABCB1, Mrp4/ABCC4 и Bcrp/ABCG2, участвующие в создании гематоретинального барьера, осуществляя перенос веществ из клеток эндотелия кровеносных сосудов и капилляров в клетки сетчатки (Tomi, Hosoya, 2010; Kubo et al., 2018). Экспериментальное моделирование гипоксической ретинопатии у мышей вызывает преретинальную неоваскуляризацию вокруг центральной, в норме бессосудистой, сетчатки, что связано с нарушением экспрессии ABCA транспортеров (Tagami et al., 2009). В другой работе выявлена роль ABCA4 в защите фоторецепторных клеток сетчатки от избыточного накопления и токсического влияния продукта метаболизма реакций зрительного цикла – 11-цис-ретиналя (Quazi, Molday, 2014).

Общий план строения сетчатки схож у всех позвоночных (рис. 1). В сетчатке позвоночных выделяют основные типы нейронов (фоторецепторы, биполярные, горизонтальные, амакриновые и гаглиозные клетки), формирующие ее радиальные слои, и четыре типа клеток глии: макроглия (глия Мюллера и астроциты), микроглия, а также олигодендроциты (локализованы преимущественно вдоль зрительного нерва). Тела нейронов формируют три ядерных слоя, которые разделены двумя сетчатыми (синаптическими) слоями волокон (аксоны и дендриты нейронов) (рис. 1). Наружный ядерный слой сетчатки представлен ядрами светочувствительных фоторецепторов – палочек и колбочек, наружные сегменты которых находятся в тесном контакте с клетками РПЭ, формирующими однорядный слой (Hoon et al., 2014; Tsukamoto, 2018).

Мы проанализировали имеющиеся в литературе сведения по экспрессии ключевых компонентов ПСС – пуринорецепторов, выявленных на уровне мРНК и/или белка в клеточных типах сетчатки позвоночных с использованием различных методов (нозерн-блот; ОТ-ПЦР; гибридизация *in situ*, иммуногистохимия, вестерн-блот гибридизация, авторадиография/связывание лигандов, исследования физиологической и фармакологической активности). Пуринорецепторы в сетчатке позвоночных представлены семью подтипами трансмембранных лиганд-управляемых ионных каналов (P2XR), восемью подтипами G-связанных рецепторов (P2YR), и характеризуются специфичным для клеток паттерном экспрессии (Jabs et al., 2000; Fries et al., 2004a, 2004b) (рис. 1). Ганглиозные клетки сетчатки экспрессируют все подтипы аденозиновых рецепторов AR, все подтипы рецепторов P2XR (за исключением P2X6R) (Puthussery, Fletcher, 2006; Guzman-Aranguez et al., 2014), большинство P2Y-рецепторов P2YR (P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y12R) (deAlmeida-Pereira et al., 2018). В горизонтальных клетках выявлена экспрессия пуринорецепторов P2X3R, P2X4R, P2X7R (Ward et al., 2010); в амакриновых клетках – A1R; P2X1R, P2X2R, P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R (Puthussery, Fletcher, 2006; Ward et al., 2010; Pannicke et al., 2014). Биполяры экспрессируют: A1R; P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R (Wheeler-Schilling et al., 2001; Vessey, Fletcher, 2012). В биполярных нейронах всех 3 подтипов выявлена также экспрессия P2X2R, P2X3R и P2X7R, которые колокализуются с ГАМК (Puthussery, Fletcher, 2006; Jacobson, Muller, 2016). В фоторецепторах (палочки, колбочки) выявлена экспрессия A1R, A2R, A2AR, A2BR, A3R; P2X2R (Greenwood et al., 1997), P2X7R (Puthussery, Fletcher, 2006; Puthussery et al., 2006; Notomi et al., 2013), P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R (Pannicke et al., 2014). В сетчатых слоях сетчатки (наружный и внутренний) идентифициро-



ARA1, ARA2B, ARA2A, ARA3; P2Y1R, P2Y2R; P2X7R

1–2 (Фп, Фк) – A1R, A2R, A2AR, A2BR, A3R; P2X2R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R

3 (Г) – P2X3R, P2X4R; P2X7R

4–5 (Бп, Бк) – A1R, A2AR, A2BR; P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R

6 (Мг) – A1R, P2X2–5 R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R

7 (А) – A1R, P2X1–5 R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R

8 (Мкг) – A2AR; P2X4R; P2X7R, P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R

9 (Гкл) – AR; P2X2–5 R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y12R

10 (Ац) – P2X4R, P2X7R; P2Y2R

Рис. 1. Распределение основных подтипов пуринергических рецепторов в клетках сетчатки и РПЭ позвоночных. (Модифицировано по: Li F., et al., 2019; Markitantova, Simirskii, 2020.). Общий план организации сетчатки позвоночных: РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; НЯС – наружный ядерный слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; НСС – наружный сетчатый слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; Гкл – слой ганглиозных клеток. 1 – фоторецепторы палочки (Фп), 2 – фоторецепторы колбочки (Фк), 3 – горизонтальные клетки (Г), 4 – палочковые биполяры (Бп), 5 – колбочковые биполяры (Бк), 6 – глия Мюллера (Мг), 7 – амакриновые клетки (А), 8 – микроглия (Мкг), 9 – ганглиозные клетки (Гкл), 10 – астроциты.

ваны P2X7R (Puthussery, Fletcher, 2004); P2X1R, P2X2, P2X4R и P2X7R (Kaneda et al., 2004), P2Y2, P2Y4 (Sugioka et al., 1999). В клетках глии Мюллера обнаружена экспрессия пуринорецепторов A1R, A2AR, A2BR; P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R, P2Y6R (Bringmann et al., 2009; Brass et al., 2012). В микроглии экспрессируются A2AR; P2X4R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R (Gu et al., 2012; Santiago et al., 2014; Ho et al., 2016); астроцитах – P2X4R, P2X7R; P2Y2R (Ho et al., 2016); олигодендроцитах – A3R (González-Fernández et al., 2014), P2X7 (Domercq et al., 2010), P2Y1 (Moran-Jimenez, Matute, 2000). В РПЭ выявлено большинство пуринорецепторов, принадлежащих всем трем подтипам: P1 – ARA1, ARA2B, ARA2A, ARA3 (Wan et al., 2011), P2: P2Y1, P2Y2 (Maminishkis et al., 2002; Pintor et al., 2004); P2X7 (Guha et al., 2013; Yang et al., 2014; Sanderson et al., 2016).

Следует отметить, что для идентификации мРНК пуринорецепторов и кодируемых ими белков, а также активности рецепторов использовались различные методы, что объясняет некоторые противоречия в данных. В частности, рецепторы P2X7R были обнаружены в биполярных клетках у крыс с помощью иммунофлуоресценции (Vessey, Fletcher, 2012), и не были обнаружены методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Wheeler-Schilling et al., 2001). Напротив, рецепторы P2Y6R были обнаружены в этих клетках с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (Fries et al., 2004b), но не детектировались с помощью иммунофлуоресценции. Иммунохимически рецепторы P2X7R выявлены в микроглии сетчатки обезьян (Gu et al., 2012), но не обнаружены в клетках микроглии у мышей (Franke et al., 2005). Рецепторы P2X2R не детектировались в фоторецепторных нейронах сетчатки крысы (Greenwood et al., 1997), а – P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R – в фоторецепторах кролика, крысы и макаки (Cowlen et al., 2003; Fries et al., 2004a; Pintor et al., 2004). Эти различия могут объясняться специфичностью использованных антител и праймеров для ПЦР, и/или различной чувствительностью методов. Другим объяснением может быть то, что, спектр пуринорецепторов и их изоформ, характер экспрессии в одноименном типе клеток может варьировать у разных видов животных.

РОЛЬ ПСС В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ И НЕЙРОТРАНСМИССИИ

В сетчатке позвоночных в процессе эмбриогенеза возникают многочисленные типы нейронов и глии, которые формируют упорядоченные слои сетчатки в строго координируемой последовательности. Порядок созревания основных клеточных типов сетчатки перекрывается на отдельных этапах гистогенеза и различается во времени у разных видов. Первыми из нейробластов появляются клетки ганглиозного слоя, затем колбочки фоторецепторов (их наружные сегменты появляются позже). За ними возникают амакриновые и горизонтальные клетки внутреннего ядерного слоя. Глия Мюллера и биполяры завершают дифференцировку позже, вслед за ними, как правило, завершают дифференцировку палочки фоторецепторов, ядра которых, вместе с ядрами колбочек фоторецепторов, образуют наружный ядерный слой сетчатки (Heavner, Pevny, 2012). Видовые различия гистогенеза сетчатки у разных позвоночных проявляются в специфичности подтипов клеток сетчатки, гетерохронности клеточных процессов гистогенеза, связанных с различной продолжительностью эмбрионального и постнатального развития (Schacher et al., 1997; Stacy, Wong, 2003), особенностями генетической и эпигенетической регуляции дифференцировки клеток сетчатки (Cvekl, Mitton, 2010). Так, у млекопитающих созревание нейронов сетчатки продолжается и в постнатальный период (Alvarez-Hernan et al., 2021).

Решающая роль в развитии РПЭ и сетчатки, уже со стадии разделения нейроэпителия глазного пузыря на проспективные РПЭ и нейральную часть сетчатки, принадлежит процессу запрограммированной клеточной гибели. Продуцируемые клетками сетчатки нейротрансмиттеры и нейромодуляторы разных классов вносят вклад в афферентный контроль апоптоза нейронов (Marc, 2003). Нарушения апоптоза на ранних стадиях формирования глаза мыши (стадия глазного бокала, E10.5) коррелируют с нарушениями дифференцировки клеток сетчатки и процесса пигментации РПЭ (Pequignot et al., 2011). Для сетчатки позвоночных характерны три пика апоптоза: первый возникает до начала нейрогенеза, второй совпадает с пиком нейрогенеза, а третий – с периодом формирования синаптических связей и уточнения проекционных связей между нейронами. Нейротрансмиттеры, в том числе принадлежащие ПСС, в сетчатке выявляются уже во время первой волны апоптоза, затрагивающей ганглиозные клетки, задолго до экспрессии нейротрофинов. Вторая волна апоптоза затрагивает, в первую очередь, клетки внутреннего ядерного слоя сетчатки. Клетки сетчатки, подвергающиеся апоптозу в ранний период развития, оказывают влияние на постмитотические незрелые нейроны, которые мигрируют к месту окончательной локализации, где достигают терминальной дифференцировки. В развивающейся сетчатке нейротрансмиттеры разных классов, в кооперации с трофическими факторами, продуцируемыми клеточным микроокружением, участвуют в регуляции чувствительности клеток к гибели (Linden et al., 2005). Реакция клеток сетчатки на действие пуриновых нейротрансмиттеров, в частности, АТФ, была выявлена в раннем эмбриональном развитии. Доказано участие АТФ в регуляции числа нейронов сетчатки, экспрессирующих рецепторы к АТФ P2X-типа (Resta et al., 2007). Важным фактором в контроле гибели дифференцирующихся клеток РПЭ и сетчатки, в процессе ее формирования, служит не только концентрация нейротрансмиттеров, но и концентрация кислорода (Geiger et al., 2002). Жизнеспособность и гибель клеток сетчатки зависит от уровня экспрессии и активности белков, регулируемых редокс-системой, которая обеспечивает поддержание в клетке окислительно-восстановительного баланса в определенном физиологическом диапазоне (Markitantova, Simirskii, 2020a). Функциональные связи между формирующимися нейронами сетчатки складываются в ходе синаптогенеза, где определяющими становятся эндогенные факторы, и нейромедиаторы играют в этом процессе ведущую роль (Linden et al., 2005; Xu, Tian, 2008). В совокупности, весь набор нейромедиаторов, присущий определенному типу клеток, определяет характер взаимодействий между нейронами и их морфологические особенности. В клетках сетчатки существует несколько механизмов, которые обеспечивают формирование нейромедиаторной связи (Pearson et al., 2002). Сигнальные системы нейротрансмиттеров и нейромедиаторов, включающие АТФ, ацетилхолин, ГАМК (гамма-аминомасляную кислоту) и глутамат, начинают участвовать в контроле процессов пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток задолго до формирования синаптических связей, используя разнообразные механизмы высвобождения из клеток, путем как везикулярного, так и невезикулярного транспорта (Attwell et al., 1993; Voigt et al., 2015). В сетчатке позвоночных в эмбриогенезе отмечено высвобождение АТФ из клеток РПЭ (Pearson et al., 2005), глии Мюллера (Vecino et al., 2016). Действие пуриновых нейротрансмиттеров, главным образом, реализуется за счет активации одного из двух семейств мембраносвязанных рецепторов: ионотропных и метаботропных связанных с G-белком. АТФ, продуцируемый клетками РПЭ, способен паракринным образом активировать рецепторы P2-типа, локализованные на клеточной мембране нейронов сетчатки: фоторецепторов, амакриновых и ганглиозных клеток (Puthussery, Fletcher, 2006; Kaneda et al., 2008), клеток микроглии (Potucek et al., 2006).

В клетках-предшественниках формирующейся сетчатки высвобождение нейротрансмиттеров было отмечено до начала синаптогенеза, по механизму везикулярного транспорта, диффузии через плазматическую мембрану клетки, с использованием невезикулярных белков-транспортеров, а также обратного захвата, например, аденозина, фосфатов, ГАМК, глутамата (Zimmermann et al., 2012; Nascimento et al., 2013). Еще одним способом высвобождения нейротрансмиттеров, преобладающим в раннем эмбриогенезе, служит временное открытие механочувствительных хемиканалов коннексина, формирующих плотные щелевые межклеточные контакты и обеспечивающих транспорт биологически активных молекул и лигандов, в том числе АТФ, между цитоплазмой клетки и внеклеточным пространством (Bennett et al., 2012). Этот механизм используется для высвобождения АТФ в субретинальное пространство в дифференцирующихся клетках РПЭ, контактирующих с клетками-предшественниками сетчатки, что стимулирует их пролиферацию (Massey et al., 2003), а также в астроцитах сетчатки мыши, *in vivo* (Xia et al., 2012; Beckel et al., 2016).

Ионотропные пуринорецепторы и рецепторы к глутамату в клетках сетчатки преимущественно вовлечены в механизмы быстрой синаптической передачи межклеточных сигналов. В основе функционирования сетчатки лежат процессы метаболизма НАДН, необходимого для производства АТФ и синтеза нейромедиаторов – глутамата и ГАМК, тогда как метаболизм РПЭ и сосудистой оболочки базируется на использовании НАДФН и ацетил-КоА (Sinha et al., 2020a). Клетки нейральной сетчатки потребляют глюкозу, никотинамид, аспартат, глутамат, цитрат и другие компоненты для поддержания активного гликолиза, митохондриального окислительного метаболизма и синтеза нейротрансмиттеров. РПЭ является основным источником аспартата и глутамата для нейральной сетчатки. Различия в потреблении продуктов метаболизма нейральной сетчаткой и РПЭ/сосудистой оболочкой подчеркивают важность поддержания метаболического обмена между этими пограничными тканями (Swarup et al., 2019).

Один из известных механизмов действия нейротрансмиттеров на ранних этапах эмбриогенеза позвоночных в модуляции процессов миграции, пролиферации, дифференцировки клеток, реализуется за счет использования вторичных мессенджеров. В формирующейся, как и зрелой сетчатке, нейротрансмиттеры могут действовать как по Ca^{2+}-независимому механизму, так и по Ca^{2+}-зависимому механизму, вызывая изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} и модулируя активность ферментных систем (Xia et al., 2012; Beckel et al., 2016). Следует отметить, что АТФ участвует в кооперации с ацетилхолином в регуляции потока ионов Ca^{2+} в дифференцированных клетках взрослой ткани сетчатки, что необходимо для обеспечения ее физиологических функций (Wu et al., 2003; Wehrwein et al., 2004). В работе Канеды (Kaneda et al., 2004) было показано, что внеклеточный АТФ ингибирует высвобождение ацетилхолина холинергическими нейронами сетчатки. С использованием методов иммунохимии, было изучено распределение пуриноцепторов P2X1R, P2X2R, P2X4R и P2X7R, по отношению к холинацетилтрансферазе в сетчатке у мышей дикого типа и трансгенных мышей, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок-репортер (GFP). Оказалось, что селективное удаление холинергических амакриновых клеток внутреннего ядерного слоя сетчатки у трансгенных мышей приводило к возрастанию иммунореактивности P2X2R в наружном сетчатом слое, на фоне понижения таковой во внутреннем сетчатом слое сетчатки. Поскольку распределение белков P2X1R, P2X4R и P2X7R в синаптических слоях сетчатки отличалось от распределения холинацетилтрансферазы, было высказано предположение о том, что избирательная экспрессия пуриноцепторов P2X2 может быть ответственна за селективное высвобождение ацетилхолина (Kaneda et al., 2004).

Различия функционально-морфологической организации сетчатки позвоночных, при сходстве основных компонентов ПСС, нейромедиаторов и консервативного регуляторного генного каскада, тесно связаны с физиологическими адаптационными особенностями путей передачи зрительного сигнала между нейронами. К примеру, в сетчатке низших позвоночных (амфибии, рептилии, рыбы) в отличие от млекопитающих, палочковые биполяры связаны напрямую с ганглиозными клетками (Schacher et al., 1997; Voelgyi et al., 2004).

УЧАСТИЕ ПСС В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СЕТЧАТКИ

Ранний период нейрогенеза в сетчатке позвоночных характеризуется усиленной пролиферацией клеток-предшественников, продуцирующих все типы нейронов и глии сетчатки, и осуществляется под контролем индуктивных или ингибирующих сигнальных путей, в которых задействованы нейромедиаторы разных классов (Prada et al., 1991; Ohnuma, Harris, 2003; Martins, Pearson, 2008). Популяция незрелых нейронов эмбриональной сетчатки является одним из основных источников пуринергических нейромедиаторов и нейротрансмиттеров (Wheeler-Schilling et al., 2001; Pearson et al., 2005). Известна функция АТФ как митогена в формирующейся сетчатке (Sholl-Franco et al., 2010), которая реализуется благодаря присущей всем нейротрансмиттерам способности модулировать потоки ионов Ca^{2+} через мембраны клеток.

Изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}регулируют успешное прохождение пролиферирующими клетками через все этапы клеточного цикла, включая переход из G_1 в S-фазу, все ключевые фазы митоза, переход из метафазы в анафазу и индукцию цитокинеза (Arredouani et al., 2010). Волнообразное возрастание транспорта ионов Ca^{2+} наблюдается во время пика нейрогенеза, и, главным образом, приурочено к процессу формирования межклеточных синаптических связей между дифференцирующимися клетками сетчатки (Pearson et al., 2002). Процессы транспорта ионов Ca^{2+}, характеризуемые определенной частотой, амплитудой и продолжительностью, также оказывают влияние на синтез нейротрансмиттеров, экспрессию специфических рецепторов в созревающих нейронах, скорость роста их нейритов (Rosenberg, Spitzer, 2011).

Разнообразие эффектов действия пуринергических нейротрансмиттеров во многом объясняется активацией тканеспецифического набора рецепторов из семейств мембрано-связанных ионотропных и метаботропных пуринорецепторов P2-типа. С использованием методов радиоавтографии и иммунохимии были получены данные об участии P2-пуринорецепторов в регуляции синтеза ДНК в сетчатке позвоночных в эмбриогенезе (Sugioka et al., 1999). Связывание АТФ с метаботропными рецепторами приводит к активации G-белка, который в зависимости от его типа запускает работу одной из нескольких эффекторных систем: фосфолипазы С, инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), аденилатциклазы или цАМФ. Активация рецепторов P2YR и P2XR, в ответ на действие нуклеотидов, приводит к мобилизации из внутриклеточных депо ионов Ca^{2+}, продукции инозитол-1,4,5-трифосфата, фосфолипазы A2, возрастанию активности аденилатциклазы и киназ PLC, PKC, MAPK (Potucek et al., 2006; Nunes et al., 2007). АТФ-индуцируемая пролиферация в клетках-предшественниках нейронов сетчатки связана с активацией вторичного мессенджера IP3 и MAPK каскада. Активация P2YR агонистами АТФ и УТФ вызывает образование фосфоинозитидов (Sanches et al., 2002) и мобилизацию внутриклеточного кальция в клетках сетчатки эмбрионов кур (Sugioka et al., 1996). На этом же объекте показано, что ингибирование сигнального пути PI3K/Akt приводит к нарушению продвижения клеток-предшественников сетчатки через G_2/M фазы клеточного цикла (Ornelas et al., 2013).

В отличие от связанных с G-белком рецепторов P2YR, лиганд-активируемые ионотропные рецепторы P2XR стимулируют быстрый приток ионов Ca^{2+} и Na^+ и отток ионов K^+. Это приводит к деполяризации плазматической мембраны и значительному увеличению концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле. Очевидно, что резкое изменение внутриклеточного гомеостаза ионов служит причиной активации нескольких вторичных мессенджеров и ферментативных каскадов, которые задействованы в стимуляции MAPK (Potucek et al., 2006). Сигнальные пути, с участием нуклеотидов, контролируют продвижение клеток по клеточному циклу и ассоциированы с интеркинетической ядерной миграцией в слое нейробластов сетчатки (Lin et al., 2006). В сетчатке деление клетки происходит во внешней апикальной области нейробласта, в то время как синтез ДНК – в его внутренней, базальной области (Dyer, Cepko, 2001). Ранее было высказано предположение о том, что нейротрансмиттеры могут модулировать пространственно-временные процессы внутриклеточного транспорта ионов Ca^{2+} в ходе интеркинетической ядерной миграции в нейробластах, что нашло подтверждение на модели эмбриональной сетчатки кур. Действие экзогенного АТФ или агониста УТФ, посредством рецепторов P2Y2R, оказалось достаточным для инициации входа ранних клеток-предшественников сетчатки (ганглиозных, амакриновых, горизонтальных, фоторецепторов) в S-фазу клеточного цикла (Pearson et al., 2005). На более поздней стадии развития сетчатки активация P2Y1R, под воздействием АТФ, способствовала инициации пролиферации биполяров и глии Мюллера. Регуляторные факторы, продуцируемые ранними постмитотическими нейронами, вызывали остановку поздних нейронов сетчатки в фазе митоза, чему сопутствовала агонист-зависимая десенсибилизация рецепторов P2R (Franca et al., 2007). В сетчатке цыпленка, на 7–8-е сут эмбрионального развития, более 75% клеток представлены популяцией вышедших из митоза клеток-предшественников ганглиозных, горизонтальных, амакриновых клеток и фоторецепторов. На 10–11-е сут эмбриогенеза большинство клеток-предшественников глии Мюллера и биполяров выходят из митоза (Prada et al., 1991). В другой работе показано, что снижение ответа клеток сетчатки на действие АТФ корреллировало с падением их пролиферативной активности, на завершающих стадиях ретиногенеза (Franca et al., 2007).

В сетчатке мыши действие эндогенного АТФ, через рецепторы P2Y1R, стимулирует вход клеток-предшественников в цикл пролиферации, в результате увеличения уровня экспрессии циклина D1 и снижения экспрессии p27kip1. В пролиферирующих нейробластах сетчатки, после действия АТФ, была выявлена корреляция между увеличением числа BrdU-позитивных клеток и возрастанием интенсивности включения другого маркера синтеза ДНК – H^3-тимидина. Влияние экзогенного АТФ проявлялось в увеличении числа PCNA- и BrdU-позитивных клеток, возрастании уровня экспрессии циклина D1 и фосфорилированного гистона H3 и снижении уровня экспрессии p27kip1, в нейробластах через 24 и 48 ч культивирования эксплантатов. АДФ, как и АТФ, также способен индуцировать синтез ДНК, через сигнальный путь, опосредованный рецепторами P2Y1R (Sholl-Franco et al., 2010). Выявлена роль АДФ как паракринного сигнала в индукции входа клеток цилиарно-маргинальной зоны (ЦМЗ) в S-фазу клеточного цикла в сетчатке низших позвоночных (Pearson et al., 2005; Ricatti et al., 2011). Пролиферативная активность клеток ЦМЗ у представителей низших позвоночных (амфибий и некоторых видов рыб) поддерживает постоянный рост сетчатки в течение всего онтогенеза (Миташов, 1969; Perron et al., 1998; Raymond et al., 2006). Снижение уровня внеклеточного АДФ, а также блокирование рецепторов P2Y1R приводило к уменьшению числа клеток ЦМЗ сетчатки, проходящих S-фазу клеточного цикла (Franca et al., 2007). Поддержание определенной концентрации внеклеточных нуклеотидов в ростовой ЦМЗ сетчатки рыб происходит за счет гидролиза АТФ эктонуклеотидазами, что является условием успешной пролиферации клеток в этой зоне (Ricatti et al., 2011).

РОЛЬ ПСС В ГОМЕОСТАЗЕ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ В СЕТЧАТКЕ

Стабильное функционирование зрелой сетчатки взрослых животных достигается за счет сложной сети взаимодействий эндогенных регуляторных систем, что обеспечивает клеточный и метаболический гомеостаз в сетчатке (Sinha et al., 2020a, 2020b; Ramachandra, Fliesler, 2021). В норме баланс метаболитов и сигнальных молекул (в частности, компонентов ПСС), постоянно поддерживается и восстанавливается в результате взаимодействия клеток нейральной сетчатки с пограничными тканями (Sinha et al., 2020b). ПСС вовлечена в диалог между нейронами и глией сетчатки в онтогенезе позвоночных. Передача пуринергических сигналов через рецепторы P2Y1R-типа, которые экспрессируются в глии и нейронах сетчатки, обеспечивает поддержание жизнеспособности фоторецепторов, а при ишемии сетчатки вовлечена в процесс гибели холинергических амакриновых клеток, в результате увеличения цитотоксического влияния кальция (Ward et al., 2010). Делеция генов пуринорецепторов P2Y1R приводит к повышенной выживаемости амакриновых клеток, и, в то же время, выраженной гибели фоторецепторов у мышей и крыс (Wurm et al., 2009; Pannicke et al., 2014). В сетчатке рыбок *Danio rerio*, у которых клетки глии являются источником для восстановления нейронов (Raymond et al., 2006), активация пуринорецепторов P2Y1R под действием АТФ играет защитную роль для внутренних нейронов сетчатки после цитотоксического повреждения (Battista et al., 2009).

В нейронах сетчатки пурины вносят вклад в сигнальную передачу быстрых возбуждающих нейронально-глиальных импульсов, осуществляют нейромодулирующий эффект, посредством рецепторов: P2X7R – в палочках фоторецепторов (Puthussery et al., 2006), P2X2R – колбочках, амакриновых и ганглиозных клетках (Puthussery, Fletcher, 2006; Kaneda et al., 2008). Благодаря активации рецепторов P2Y1R и P2Y2R нейроны сетчатки реагируют на действие внеклеточного АТФ повышением содержания внутриклеточного кальция (Newman, 2006), осуществляется абсорбция избытка жидкости во внеклеточном пространстве, необходимая для поддержания гомеостаза РПЭ и пограничных с ним тканей – фоторецепторов сетчатки и сосудистой оболочки (Maminishkis et al., 2002). Специфический набор пуринорецепторов на поверхности глии Мюллера взаимодействует с АТФ и продуктами его метаболизма АДФ и АМФ, высвобождаемыми его нейронами сетчатки. Пуринорецепторы P2Y1R и AR являются основными в обеспечивании поддержания объема клеток глии Мюллера (Metea, Newman, 2006).

Длительное нарушение гомеостаза, вызванное наследственными факторами, повреждением РПЭ и сетчатки, факторами стресса, в большинстве случаев необратимо и приводит к патологическим процессам (апоптоз, воспаление) а, в конечном итоге, к гибели тех или иных клеток сетчатки и потере зрения (Markitantova, Simirskii, 2020b; Pîrvu et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Дегенеративные заболевания сетчатки характеризуются избыточным уровнем внеклеточного АТФ, что способствует инициации апоптоза клеток РПЭ, фоторецепторов, ганглиозных клеток (Notomi et al., 2013). При гибели фоторецепторов наружного ядерного слоя у млекопитающих в сетчатке происходят негативные изменения, связанные с отмиранием нейронов в других слоях сетчатки, гипертрофией глии Мюллера, нарушением послойной организации выживших нейронов. Процессы массовой гибели нейронов сетчатки сопровождаются формированием новых хаотических синаптических связей, так называемых микронейром, неспособных поддерживать нормальный процесс передачи зрительных сигналов, что приводит к ухудшению зрения (Marc, 2003). Если на ранней стадии удается затормозить процесс гибели нейронов сетчатки, то на поздних стадиях эти процессы приобретают необратимый характер.

В условиях патологии клетки глии сетчатки млекопитающих продуцируют избыточное количество АТФ во внеклеточное пространство, с помощью экзоцитоза, в ответ на осмотическую или механическую стимуляцию, например, при отслойке сетчатки, локальной травме или повреждении светом (Uckermann et al., 2006; Vecino et al., 2016). Избыточная продукция клетками

АТФ во внеклеточное пространство служит эндогенным “сигналом опасности” при окислительном и осмотическом стрессе, воспалении, нарушениях метаболизма, гипоксии, ишемии, повреждении зрительного нерва (Uckermann et al., 2006; Notomi et al., 2013). В зоне повреждения ткани сетчатки запускается каскад защитных реакций, медиаторами которых выступают ионы Ca^{2+}, АТФ и активные формы кислорода (АФК), высвобождающиеся из гибнущих клеток в межклеточное пространство. Пуринергические сигналы, под действием избытка АТФ, в которых задействованы рецепторы P2X7R, являются центральным звеном в индукции гибели РПЭ, нейронов сетчатки, клеток сосудов при возрастной макулярной дегенерации сетчатки (ВМД), диабетической ретинопатии, пигментном ретините, глаукоме (Puthussery, Fletcher, 2006; Fowler et al., 2014). Ранние молекулярные события глиоза, связанные с выбросом АТФ, стимулируют возрастание уровня перекиси водорода, оксида азота (NO), возрастанию концентрации P2-опосредованного внутриклеточного Ca^{2+} и гиперактивации P2X7R. Описанные реакции служат сигналом, инициирующим процессы эндогенной защиты и репарации сетчатки. Общим для всех этих моделей является метаболический стресс, при котором происходит выброс АТФ, стимулирующий клеточную нейротоксичность, опосредованную рецепторами P2X7R (Mitchell, 2001; Reichenbach, Bringmann, 2016). Рецепторы P2X7R представляют собой катионные каналы, активируемые высокими концентрациями АТФ. При длительной активации эти каналы объединяются с мембранными белками, образуя широкие поры, что и приводит к увеличению высвобождения АТФ во внеклеточную среду и гибели клеток (Andrejew et al., 2020). Высокая концентрация внеклеточного АТФ является пусковым звеном в механизмах гибели перицитов микроциркуляторного русла и снижению кровотока в сосудах сетчатки, опосредованных активацией P2X7R. Развивающийся при ВМД (возрастная макулярная дистрофия сетчатки) метаболический стресс, связанный со снижением продукции NO клетками эндотелия сосудов сетчатки, вызывает деполяризацию клеток, летальный для клеток приток кальция через потенциал-управляемые кальциевые каналы, дегенерацию клеток микроциркуляторного русла. Показано, что NO в микрососудах сетчатки участвует в подавлении избыточной патологической активности кальциевых каналов в результате активации рецепторов P2Y4R, что предотвращает образование пор рецепторами P2X7R и усиленное высвобождение АТФ во внеклеточную среду (Bhutto et al., 2010; Sugiyama et al., 2010).

Критическим событием в инициации гибели клеток РПЭ и клеток сетчатки является длительная перегрузка цитозоля и митохондрий ионами Ca^{2+}, вследствие избыточной активности ионотропных рецепторов к глутамату и пуринам, потенциал-управляемых кальциевых каналов (Bringmann et al., 2009). В развитие цитотоксической перегрузки кальцием в клетках РПЭ, как и в нейральной сетчатке, вносит вклад гиперстимуляция рецепторов P2XR, которые служат непосредственными проводниками кальция, и вызывая деполяризацию клеточных мембран, стимулируют активность потенциал-управляемых кальциевых каналов. Так, активация P2X7R в клетках РПЭ при ВМД вызывает подщелачивание лизосом и нарушает их функции, что приводит к повышенному окислению липидов, накоплению избыточного количества липофусцина в наружных сегментах фоторецепторов, подвергающихся фагоцитозу, возникновению акумулирующих липопротеины друз, характерных для РПЭ при патологиях (Guha et al., 2013). Важным звеном в механизмах гибели клеток РПЭ, при хориоидальной форме ВМД, географической атрофии (возрастной дегенерации желтого пятна) является P2X7R-опосредованная активация инфламмасом NLRP3 и каспаз, на фоне возрастания продукции АФК (Tarallo et al., 2012; Fowler et al., 2014).

Данные, полученные на моделях метаболического стресса, при повреждении зрительного нерва *in vivo* и моделировании экспериментальной ишемии сетчатки человека в эксплантатах ткани в системе *in vitro*, показали, что рецепторы P2X7R вовлечены в механизмы гибели ганглиозных клеток (Zhang et al., 2006; Niyadurupola et al., 2013; Sugiyama, 2014). Кратковременная стимуляция P2X7R вызывает повышение уровня кальция, а их длительная стимуляция приводит к гибели ганглиозных клеток через активацию потенциал-управляемых кальциевых каналов, поддерживающих повышенный уровень свободного кальция в цитозоле, что инициирует активность каспаз (Hu et al., 2010; Pannicke et al., 2014). Гибель микроглии, вызванная длительной стимуляцией P2X7R, также опосредована активностью каспаз 1, 3 и 8 (Ferrari et al., 2006; DiVirgilio et al., 2017). Высвобождаемые из микроглии мыши АТФ и метаболиты индуцируют фосфорилирование CREB, экспрессию цАМФ (Ghosh et al., 2015). Активация рецепторов P2Y1R и P2X7R в микроглии ведет к повышению экспрессии фосфолипаз A2 и D, усилению фосфорилирования тирозина, запуску MAPK-каскада, синтезу провоспалительных цитокинов, факторов регуляции транскрипции NF-kB, CREB и AP-1 (Potucek et al., 2006; Ventura et al., 2019). Перечисленные факторы транскрипции запускают экспрессию генов воспалительного ответа – индуцибельной синтазы NO iNOS и COX-2 (Ghosh et al., 2015). В частности, индуцибельная синтаза iNOS, продуцируемая в ганглиозных клетках и клетках внутреннего ядерного слоя сетчатки (амакриновые и горизонтальные клетки), с участием цГМФ, задействована в сигнальных путях, которые запускают гибель ганглиозных и фоторецепторных клеток сетчатки. Эти же компоненты сигнальных путей задействованы в механизмах защиты от гибели недифференцированных постмитотических нейронов сетчатки (Sinha et al., 2020a). Модели *in vivo* ишемической пролиферативной ретинопатии мыши, после нокаута iNOS или после действия ингибитора 1400W, показали, что роль iNOS состоит в локальной индукции апоптоза в бессосудистом внутреннем ядерном слое сетчатки. Возрастание уровня экспрессии iNOS в бессосудистой части сетчатки при пролиферативной ретинопатии *in vivo* является пусковым механизмом в развитии неоваскулярных и дегенеративных заболеваний сетчатки человека при гипоксии, поэтому iNOS рассматривается в качестве фармакологической мишени для улучшения кровоснабжения сетчатки и ее защиты от дегенерации (Sennlaub et al., 2002).

Показано, что активация рецепторов P2YR и факторов роста, в ответ на действие АТФ, вовлечены в патогенез ВМД и диабетической ретинопатии (Mishra et al., 2006; Yang, Chen, 2014). Возрастание активности пуринорецепторов типа P2YR вызывает быстрый выброс кальция из внутренних депо клеток, за которым следует более устойчивый длительный приток кальция, высокие концентрации которого токсичны для клетки (Hu et al., 2010; Pannicke et al., 2014). Отмечена вовлеченность рецепторов образующегося при гидролизе АТФ аденозина – A2AR, A2BR, A3R в передачу сигналов, провоцирующих развитие неоваскуляризации сетчатки человека при ВМД (Liu et al., 2010; Zhang et al., 2015). При этом, действие аденозина на AR3 рецепторы обладает противоположным эффектом, останавливая возрастание внутриклеточной концентрации кальция (Zhang et al., 2006).

Общим свойством в дегенерации сетчатки при патологиях глаза, таких как ВМД, диабетическая ретинопатия, пролиферативная витреоретинопатия, глаукома, является активация микроглии (Vecino et al., 2015), в регуляции которой участвуют нейроны, астроциты, макроглия Мюллера, а также Т-клетки (Sanderson et al., 2014; Madelung et al., 2015). Глия сетчатки первой реагирует на повышение внутриглазного давления при глаукоме, характеризующейся прогрессирующей дегенерацией сетчатки (Seitz et al., 2013). Переход глии Мюллера и микроглии к реактивному фенотипу, при гипоксии сетчатки, инициирует сигнальные каскады, которые не только участвуют в контроле гибели нейронов сетчатки, но также выполняют функцию нейропротекции (Ghosh et al., 2015). При этом активация пуринорецепторов P2Y1R также может проявлять двойственный эффект: с одной стороны – усиливать пролиферацию и гипертрофию клеток Мюллера и астроцитов, а с другой – снижать апоптотическую гибель клеток сетчатки, индуцируемую гипоксией (Wang, Harris, 2005; Pannicke et al., 2014). Нейропротекторная роль глии Мюллера связана с гомеостатической сигнальной сетью, в которую встроены разные типы глии сетчатки, обеспечивающие поддержание или восстановление функции фоторецепторов и ганглиозных нейронов сетчатки в норме и при нарушениях гомеостаза (Vecino et al., 2016). При глаукоме нейропротекторный эффект глии Мюллера на ганглиозные клетки сетчатки состоит в их защите от дальнейшего повреждения за счет продукции нейротрофических факторов, антиоксидантов и нейротрансмиттеров, а микроглии – в макрофагальной активности и секреции факторов роста (Seitz et al., 2013; Liu et al., 2019). Кроме того, глия Мюллера является латентным прогенитором для восстановления утраченных нейронов сетчатки, а клетки микроглии и астроциты предположительно участвуют в упрощении (редуцировании) межклеточных синаптических связей (Vecino et al., 2016).

Очевидно, что физиологически защитная роль пуринергической стимуляции в клетках сетчатки зависит от баланса между компонентами про-дегенеративных и анти-дегенеративных путей передачи сигнала. Для поддержания необходимого количества дифференцирующихся клеток сетчатки в развитии и для обеспечения физиологических функций клеток в зрелой сетчатке важен баланс между уровнем нейротрансмиттеров и продуктов их метаболизма, а также трофических (BDNF, FGF, NO и др.) и апоптотических факторов (NGF, TGF и др.) (Kimura et al., 2016). Патологические изменения, затрагивающие сетчатку, прогрессируют достаточно быстро. Ввиду неоднозначного ответа глии на стресс, исследование механизмов участия ПСС в активации клеток Мюллера и астроцитов приобретает первостепенное значение для разработки стратегий, направленных на "спасение" нейронов сетчатки (Ventura et al., 2019). С одной стороны, эти исследования тесно связаны с изучением клеточных источников – резервов для восстановления и поддержания гомеостаза сетчатки (Ricatti et al., 2011; Illes, Rubini, 2017; Singh et al., 2018), с другой – с поиском эффективных молекулярных мишеней в терапии нейродегенеративных заболеваний (Burnstock, Ulrich, 2011; Illes, Rubini, 2017).

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПСС В НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

Наиболее эффективными в терапии патологий, затрагивающих сетчатку и РПЭ, и функционирование глаза в целом, являются стратегии нейропротекции, направленные на восстановление гомеостаза сетчатки, как клеточного, так и метаболического (рис. 2). Фармакологические

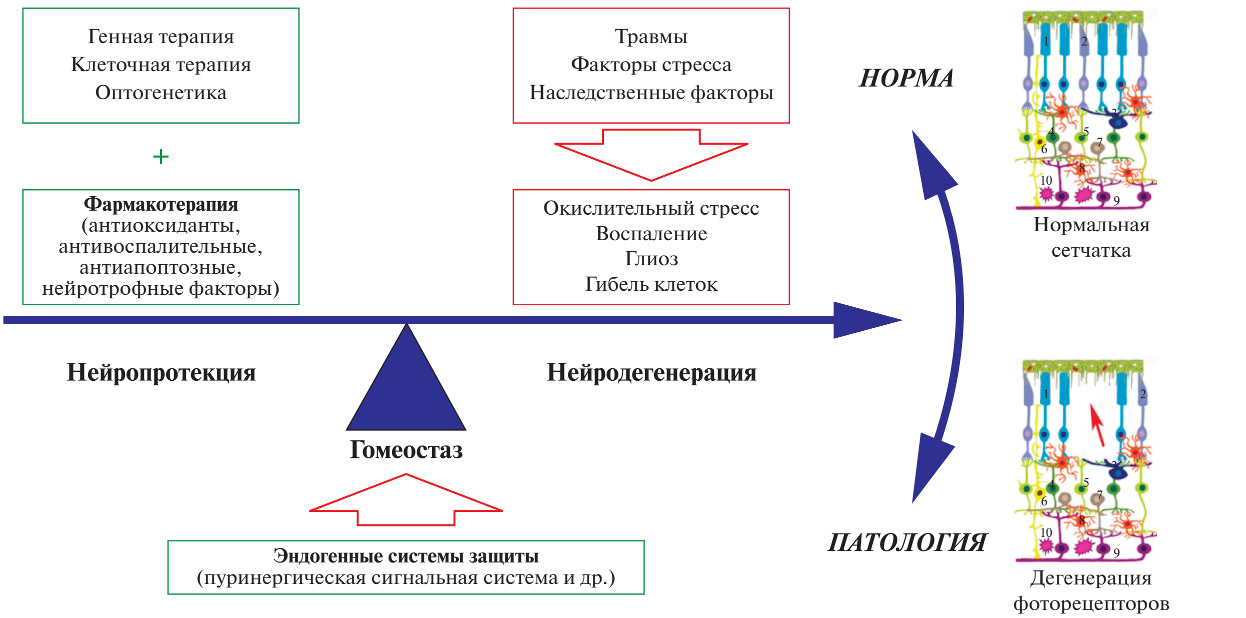


Рис. 2. Стратегии нейропротекции при дегенеративных заболеваниях сетчатки (модифицировано по Markitantova, Simirskii, 2020 и Maneu et al., 2022). Эндогенные системы защиты (пуринергическая и др.) обеспечивают поддержание гомеостаза и функционирование сетчатки. Экстремальные воздействия, сопровождающиеся нарушениями и гибелью клеток сетчатки, перечислены в красных квадратах справа, а стратегии, применяемые для восстановления гомеостаза сетчатки и предотвращения дегенерации ее клеток – в зеленых квадратах слева. Красная стрелка на схеме сетчатки указывает на участок, в котором отсутствуют фоторецепторы и клетки пигментного эпителия. 1 – фоторецепторы палочки, 2 – фоторецепторы колбочки, 3 – горизонтальные клетки, 4 – палочковые биполяры, 5 – колбочковые биполяры, 6 – глия Мюллера, 7 – амакриновые клетки, 8 – микроглия, 9 – ганглиозные клетки, 10 – астроциты.

методы предусматривают уменьшение степени воспаления в сетчатке глаза за счет блокирования избыточной активности микроглии и снижения реактивного глиоза (Bringmann et al., 2009). В основе развития биомедицинских подходов к сетчатке лежат достижения клеточных и геномных технологий, разрабатываемых на животных моделях *in vivo*, культурах и системах *in vitro-like-in vivo* (Grigoryan et al., 2012; Capowski et al., 2019; Dopper et al., 2020). Ряд методов терапии нейродегенеративных заболеваний сетчатки глаза человека основан на использовании молекулярных компонентов ПСС и подконтрольных сигнальных каскадов, в качестве мишеней действия фармакологических препаратов (Fowler et al., 2014). При этом большая часть исследований сосредоточена вокруг выяснения роли пуринорецепторов в механизмах нейродегенерации, поиска селективных агонистов и блокаторов, клеточных и молекулярных мишеней (Eltzschig et al., 2012; MacNair et al., 2016; Boia et al., 2020). Для изучения роли регуляторных сигнальных путей в клетках сетчатки, тестирования лекарственных препаратов, используются имитирующие ткань *in vivo* системы – органоиды, в которых обнаружены метаболические характеристики клеток сетчатки: экспрессия компонентов ППС, нейротрансмиттеров, транспортеров, ферментов, ответственных за метаболизм аспартата и глутамата (Browne et al., 2017). Однако, ограничения данного подхода, связанные с нарушениями взаимодействий между пограничными тканями, проявляются в неполной клеточной организации сетчатки (отсутствие ганглиозного слоя, нарушения синаптогенеза и васкулогенеза), что затрудняет моделирование молекулярных и метаболических процессов, свойственных этой ткани *in vivo* (McMurtrey, 2016).

Лечению глазных заболеваний пуринергическими препаратами посвящен ряд обзоров, поскольку пуринорецепторы остаются в ряду перспективного фармакологического потенциала в терапии заболеваний сетчатки и стимуляции заживления ткани при ее повреждении (Guzman-Aranguez et al., 2014; Sanderson et al., 2014; Beckel et al., 2016; Reichenbach, Bringmann, 2016). Идея о том, что антагонисты P2X7R могут найти применение в предотвращении в сетчатке апоптоза нейронов, при действии высоких доз АТФ, гипоксии, была высказана ранее и нашла подтверждение в нескольких работах (Hu et al., 2010; Sugiyama et al., 2010; Sakamoto et al., 2015). В одной из этих работ была обнаружена перспективность использования антагонистов P2X7R для терапии глаукомы, сопровождаемой прогрессирующей гибелью ганглиозных клеток и атрофией зрительного нерва (Sakamoto et al., 2015). Стратегия деактивации P2X7R может быть использована для лечения хориоидальной формы ВМД, а также возрастной дегенерации желтого пятна (географической атрофии) сетчатки (Olivier et al., 2016). Для лечения этих патологий, также была предложена стратегия, основанная на использовании ингибиторов обратной транскриптазы нуклеозидов, которая направлена на блокирование активности каспазы-1, ключевого эффектора инфламмасом NLRP3, индуцированной Alu PHK (Fowler et al., 2014). Полиморфизмы одиночных нуклеотидов в генах, кодирующих пуринергические рецепторы, также служат основой для разработки диагностических биомаркеров патологий сетчатки глаза (Caseley et al., 2014). Все больший интерес в качестве потенциальных исходных терапевтических мишеней и биомаркеров заболеваний приобретают микроРНК, модулирующие работу ППС (Ferrari et al., 2016). В настоящее время в клинической практике известно несколько примеров применения фармакологических препаратов на основе пуринов и их производных, агонистов и антагонистов для лечения патологий глаза, затрагивающих сетчатку и РПЭ. Представлены доказательства эффективности антагонистов аденозиновых рецепторов для лечения глаукомы (Zhong et al., 2013). Диаденозин тетрафосфат (Ap4A), являющийся ингибитором пуринорецепторов P2Y1 и P2Y12, был заявлен в качестве эффективного химического соединения для лечения этой патологии (Fonseca et al., 2017). Агонист рецепторов P2Y2R – INS37217, усиливает реабсорбцию субретинальной жидкости, и стоит в ряду перспективных фармакологических средств, которые могут быть направлены на терапию отслоения сетчатки (Maminishkis et al., 2002; Meyer et al., 2002). Антагонист P2X7R и агонисты рецепторов A3R применяются в лечении диабетической ретинопатии (Sugiyama, 2014; Reichenbach, Bringmann, 2016), дегенерации фоторецепторов сетчатки (Hu et al., 2015; Ho et al., 2016), антагонист P2Y12R клопидогрел – в терапии развития тромбоза сосудов сетчатки (Oh et al., 2011). Агонисты A2AR используются для лечения нейродегенеративных патологий, и, возможно, вскоре найдут более широкое применение (Andrejew et al., 2020).

Несмотря на длительную историю исследований пуринов, клинические вмешательства с использованием компонентов ПСС для лечения широкого спектра заболеваний сетчатки сопряжены с рядом трудностей. Ввиду широкой представленности пуринорецепторов и их изоформ в разных тканях организма проблема избирательного фармакологического воздействия на определенные типы клеток остается нерешенной. Многообещающим в офтальмологии является поиск новых блокаторов P2X7R для лечения воспалительных заболеваний, однако, наличие полиморфных вариантов этих рецепторов затрудняет разработку селективных антагонистов для конкретной патологии. Отсутствие устоявшихся пуринергических методов лечения связано с относительно небольшим количеством агонистов и антагонистов, характеризующихся избирательностью к подтипам пуринорецепторов, и которые были бы не только эффективными, но и стабильными *in vivo* (Jacobson, Muller, 2016). Так, продолжают разрабатываться терапевтические подходы, предусматривающие применение новых компонентов ППС, стабильных *in vivo*: эктонуклеотидаз для нормализации баланса АТФ и аденозина, а также ингибиторов избыточного высвобождения из клеток АТФ (Traba et al., 2011; Andrejew et al., 2020). Накопление сведений о роли АТФ-связывающих кассетных транспортеров ABC в нормальном метаболизме и при его нарушениях способствует развитию стратегий безопасного и эффективного введения фармакологических препаратов (в частности, новорожденным и взрослым пациентам с сосудистыми заболеваниями глаз), поскольку системное введение некоторых лекарств остается малоэффективным (Liu, Liu, 2019).

Работа ПСС тесно связана с другими эндогенными системами, и, следовательно, предоставляет множество потенциальных клеточных и молекулярных мишеней. Большинство пуриноцепторов широко экспрессируются в эндокринных органах (Burnstock, Knight, 2004), однако сведения о механизмах взаимодействия ПСС с эндокринной системой остаются далеко неполными (Burnstock, 2014; Bjelobaba et al., 2015), а в отношении РПЭ и сетчатки отсутствуют. С использованием современных методов транскриптомики и протеомики единичных клеток, продолжается поиск регуляторов экспрессии компонентов пуринергического каскада: пуринорецепторов, ингибиторов и активаторов метаболизма и транспорта АТФ. Выявление взаимодействий ПСС с другими регуляторными системами межклеточной передачи сигналов сохраняет свою актуальность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные процессы в развитии и функционировании сетчатки позвоночных динамичны, осуществляются за счет согласованной работы специализированных нейронов и глии и взаимодействия с пограничными тканями – РПЭ и сосудистой оболочкой. ПСС вовлечена в регуляцию пролиферации клеток-предшественников, гибели, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток сетчатки (Burnstock, Ulrich, 2011; Ventura et al., 2019). Ключевые компоненты пуринома: нуклеотиды, нуклеозиды, пуринорецепторы, традиционно стоят в ряду основных мишеней для генотерапевтического воздействия и разработки способов доставки фармакологических препаратов в клетки (King et al., 2006; Abbracchio et al., 2009; Singh et al., 2018; Spinozzi et al., 2021), особенно в отношении тканей заднего сектора глаза, характеризующихся низкой биологической доступностью.

В соответствии с накопленными к настоящему времени многочисленными экспериментальными и клиническими данными, сигнальные каскады, опосредованные рецепторами P2Y-типа, могут оказывать как нейротоксическое, так и нейропротекторное действие в сетчатке в онтогенезе, при патологиях и повреждении ткани. Один и тот же подтип пуринергических рецепторов P2Y1R в разных сигнальных каскадах может участвовать в процессах дегенерации в одних нейронах сетчатки (ганглиозные, фоторецепторы) (Ward et al., 2010), и выполнять функцию нейропротекции в других (амакриновые, горизонтальные) (Battista et al., 2009; Pannicke et al., 2014). ПСС оказывает модулирующее влияние на характер экспрессии в РПЭ и сетчатке генов, принадлежащих к разным функциональным группам, индуцируя или репрессируя их работу (Dale, 2008; Ricatti et al., 2011; Gampe et al., 2015). При общности некоторых важных звеньев клеточных и молекулярных процессов, существуют эволюционно закрепленные функциональные различия клеточного ответа в сетчатке (Casco-Robles et al., 2016). В ответ на действие пуринов в сетчатке возможны проявления вариабельности клеточного ответа (скорость и степень пролиферации и гибели клеток, функциональная состоятельность ткани, полнота восстановительных процессов). Один и тот же общий стимул может приводить к активации пуринергических рецепторов разного типа (изоформ), что может находить отражение в разнообразии используемых сигнальных путей, механизмов и проявляемых эффектов их воздействия на клетки сетчатки (Ward et al., 2010; Glaser et al., 2012). С одной стороны, внеклеточный АТФ и его метаболиты (аденозин) стимулируют секрецию факторов стресса, а с другой – принимают участие в индукции эндогенных систем, работа которых направлена на защиту клеток сетчатки от гибели и поддержание их жизнеспособности (Sanderson et al., 2014).

Стоит подчеркнуть существование различий в генных сетях, контролирующих клеточные процессы и гомеостаз тканей глаза у позвоночных в онтогенезе и в ответ на разные виды стресса. В клетках РПЭ взрослых млекопитающих (человека, мыши) при моделировании ВМД сетчатки обнаружены отличия профиля экспрессии генов (качественные и количественные) от профиля, характерного для эмбриональных тканей. Различия также носят таксоноспецифичный характер и связаны со спецификой работы сигнальных путей в норме и при развитии патологических процессов в сетчатке (Erb, Weisman, 2012; Bennis et al., 2015; Mellough et al., 2019). Ввиду того, что работа ПСС связана с другими эндогенными системами, проявляемые в сетчатке эффекты не всегда равнозначны. С одной стороны, избыточная активация пуриновых сигналов сопровождает хроническое воспаление при патологиях сетчатки. С другой, нуклеотиды, будучи вовлеченными в механизмы инициации апоптоза, могут предотвращать вторичное развитие воспалительных реакций и некроза в поврежденной ткани сетчатки. Двойственная роль пуринов в клетках сетчатки млекопитающих, направленная на защиту или повреждение, зависит от физиологического состояния ткани и ее ответа на действие экстремальных факторов (окислительный стресс, воспаление, механическое повреждение) (Burnstock, 2016). Эффекты нуклеотидов в сетчатке во многом определяются их концентрацией, продолжительностью стимуляции пуринорецепторов и их изоформ, а также молекулярным контекстом (Ferrari et al., 2006; Hu et al., 2010; Pannicke et al., 2014). Отличия находят отражение во взаимодействиях компонентов ПСС и гомеобокссодержащих генов у низших и высших позвоночных (Dale, 2008; Masse, Dale, 2012; Gampe et al., 2015). В связи с этими фактами, изучение роли компонентов ПСС в клеточных процессах сетчатки и РПЭ тесно связано с характеристикой молекулярно-генетического портрета клеток и сигнальных путей, поиском факторов ниш, обеспечивающих специализацию и поддержание гомеостаза этих тканей глаза (Tian et al., 2015; Swarup et al., 2019).

Разнообразие проявлений действия пуринов в одноименной ткани обусловливает необходимость сравнительного анализа моделей сетчатки *in vivo* и *in vitro*, выявления таксоноспецифичных особенностей, мишеней, вовлеченных в пуринергические регуляторные каскады. Очевидно, что сложность работы ПСС в сетчатке во многом обусловлена тем, что ее ключевые компоненты, а также ряд эффекторных молекул, являются общими звеньями, которые связывают работу многочисленных сигнальных путей (Weick et al., 2005; Ventura et al., 2019). Понимание того, как работа ПСС в сетчатке интегрирована с другими эндогенными системами (иммунной, эндокринной, редокс-системой), способствует развитию экспериментально обоснованной базы для разработки способов поддержания жизнеспособности клеток нейральной сетчатки и РПЭ. Рассмотрение вопросов взаимодействия этих регуляторных систем в сетчатке глаза позвоночных выходит за рамки настоящего обзора.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку материалов и написание обзора.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	аденозинтрифосфат
АДФ	аденозиндифосфат
АМФ	аденозинмонофосфат
АТФаза	аденозинтрифосфатаза
ацетил-КоА	ацетилкофермент А
ВМД	возрастная макулярная дистрофия сетчатки
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НАДФН	никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат
ПСС	пуринергическая сигнальная система
РПЭ	ретинальный пигментный эпителий
Транспортеры ABC	транспортные белки, содержащие АТФ-связывающий домен
УТФ	уридинтрифосфат
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	циклический гуанозинмонофосфат
ALP (alkaline phosphatase)	щелочная фосфатаза
AR	метаботропные рецепторы к аденозину
BDNF (brain-derived neurotrophic factor)	нейротрофический фактор мозга
BrdU (Bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine)	бромдезоксиуридин
CNT (concentrative nucleoside transporter)	концентрационные нуклеозидные транспортеры
eN (ecto-5'-nucleotidase)	экто-5'-нуклеотидаза
ENT	равновесные нуклеозидные транспортеры
ENTPD	эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза
ENPP	эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстераза
FGF (fibroblast growth factor)	фактор роста фибробластов
G2 (period of rapid cell growth and protein synthesis in cell cycle preceding mitosis)	постсинтетическая или премитотическая фаза клеточного цикла
NO (nitric oxide)	оксид азота
iNOS (inducible nitric oxide synthase)	индуцибельная синтаза оксида азота
IP3 (inositol trisphosphate)	инозитол-1,4,5-трифосфат
M	фаза митоза
MAPK (mitogen-activated protein kinase)	митоген-активируемая протеин киназа
NGF (nerve growth factor)	фактор роста нервов
P2XR (ATP-gated P2X receptor cation channel family)	семейство АТФ-управляемых катионных каналов рецептора P2X
P2YR	метаботропные связанные с G-белком рецепторы
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	ядерный антиген пролиферирующих клеток
PI3K/Akt	сигнальный путь
PKC (protein kinase C)	протеин киназа С
PLC (phospholipase C)	фосфолипаза-С
S-фаза	фаза репликации ДНК
TGF (transforming growth factor)	трансформирующий фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Миташов В.И. Характеристика митотических циклов клеток пигментного эпителия и зачатка сетчатки у взрослых тритонов (*Triturus cristatus*, *Triturus taeniatus*) // Докл. АН СССР. 1969. Т. 189. № 3. С. 666–669.

Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhratsky A. et al. Purinergic signaling in the nervous system: a noverview // Trends Neurosci. 2009. V. 32. № 1. P. 19–29.

Ahn J., Molday R.S. Purification and characterization of ABCR from bovine rod outer segments // Methods Enzymol. 2000. V. 315. P. 864–879.

Akanuma S., Soutome T., Hisada E. et al. Na+-independent nucleoside transporters regulate adenosine and hypoxanthine levels in Müller cells and the inner blood-retinal barrier // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. № 2. P. 1469–1477.

Alvarado-Castillo C., Harden T.K., Boyer J.L. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleosidetriphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2 // Mol. Pharmacol. 2005. V. 67. № 1. P. 114–122.

Alvarez-Hernan G., de Mera-Rodríguez J.A., Ganan Y. et al. Development and postnatal neurogenesis in the retina: a comparison between altricial and precocial bird species // Neural Regen. Res. 2021. V. 16. № 1. P. 16–20. https://doi.org/10.4103/1673-5374.286947

Andrejew R., Oliveira-Giacomelli A., Ribeiro D.E. et al. The P2X7 receptor: Central hub of brain diseases // Front. Mol. Neurosci. 2020. V. 13. Article № 124.

Arredouani A., Yu F., Sun L. et al. Regulation of store-operated Ca^{2+} entry during the cell cycle // J. Cell Sci. 2010. V. 123. № 13. P. 2155–2162.

Attwell D., Barbour B., Szatkowski M. Nonvesicular release of neurotransmitter // Neuron. 1993. V. 11. № 3. P. 401–407.

Battista A.G., Ricatti M.J., Pafundo D.E. et al. Extracellular ADP regulates lesion-induced *in vivo* cell proliferation and death in the zebrafish retina // J. Neurochem. 2009. V. 111. № 2. P. 600–613.

Beckel J.M., Lu W., Civan M.M. et al. Treatment of retinal disorders with purinergic drugs: beyond receptors // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2016. V. 32. P. 488–489.

Bjelobaba I., Janjic M.M., Stojilkovic S.S. Purinergic signaling pathways in endocrine system // Auton Neurosci. 2015. V. 191. P. 102–116.

Bennett M.V., Garre J.M., Orellana J.A. et al. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons // Brain Res. 2012. V. 1487. P. 3–15.

Bennis A., Gorgels T.G.M.F., ten Brink J.B. et al. Comparison of mouse and human retinal pigment epithelium gene expression profiles: potential implications for age-related macular degeneration // PLoS One. 2015. V. 10(10):e0141597.

Bhutto I.A., Baba T., Merges C. et al. Low nitric oxide synthases (NOS) in eyes with age-related macular degeneration (AMD) // Exp. Eye Res. 2010. V. 90. № 1. P. 155–167.

Boia R., Ruzafa N., Aires I.D. et al. Neuroprotective strategies for retinal ganglion cell degeneration: Current status and challenges ahead // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 7. Article № 2262.

Brass D., Grably M.R., Bronstein-Sitton N. et al. Using antibodies against P2Y and P2X receptors in purinergic signaling research // Purinergic Signal. 2012. V. 8. Suppl. 1. P. 61–79.

Bringmann A., Iandiev I., Pannicke T. et al. Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects // Prog. Ret. Eye Res. 2009. V. 28. № 6. P. 423–451.

Browne A.W., Arnesano C., Harutyunyan N. et al. Structural and functional characterization of human stem-cell-derived retinal organoids by live imaging // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. V. 58. № 9. P. 3311–3318.

Burnstock G. Shortand long-term (trophic) purinergic signaling // Phil. Trans. R. Soc. B. 2016. V. 371. Article № 20150422.

Burnstock G. Purinergic signalling in endocrine organs // Purinergic Signal. 2014. V. 10. P. 189–231.

Burnstock G., Knight G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems // Int. Rev. Cytol. 2004. V. 240. P. 31–304.

Burnstock G., Ulrich H. Purinergic signalling in embryonic and stem cell development // Cell Mol. Life Sci. 2011. V. 68. № 8. P. 1369–1394.

Carneiro A.C.D., Fragel-Madeira L., Silva-Neto M.A. et al. A role for CK2 upon interkinetic nuclear migration in the cell cycle of retinal progenitor cells // Dev. Neurobiol. 2008. V. 68. № 5. P. 620–631.

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. Article № 33761.

Caseley E.A., Muench S.P., Roger S. et al. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 13344–13371.

Capowski E.E., Samimi K., Mayer S.J. et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines // Development. 2019. V. 146. № 1. Article № dev171686.

Cowlen M.S., Zhang V.Z., Warnock L. et al. Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by *in situ* hybridization // Exp. Eye Res. 2003. V. 77. P. 77–84.

Cunha-Vaz J., Bernardes R., Lobo C. Blood-retinal barrier // Eur. J. Ophthalmol. 2011. V. 21. Suppl. 6. P. 3–9.

Cvekl A., Mitton K.P. Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease // Heredity (Edinb.). 2010. V. 105. № 1. P. 135–151.

Dale N. Dynamic ATP signalling and neural development // J. Physiol. 2008. V. 586. № 10. P. 2429–2436.

De Almeida-Pereira L., Repossi M.G., Magalhaes C.F et al. P2Y12 but not P2Y13 purinergic receptor controls postnatal rat retinogenesis *in vivo* // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55. № 11. P. 8612–8624.

Di Virgilio F., Ben D.D., Sarti A.C. et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation // Immunity. 2017. V. 47. № 1. P. 15–31.

Domercq M., Perez-Samartin A., Aparicio D. et al. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes // Glia. 2010. V. 58. № 6. P. 730–740.

Dyer M.A., Cepko C.L. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations // J. Neurosci. 2001. V. 21. № 12. P. 4259–4271.

Dopper H., Menges J., Bozet M. et al. Differentiation protocol for 3D retinal organoids, immunostaining and signal quantitation // Curr. Protocols. 2020. V. 55. № 1. Article № e120.

Eltzschig H.K., Sitkovsky M.V., Robson S.C. Purinergic signaling during inflammation // N. Engl. J. Med. 2012. V. 367. № 24. P. 2322–2333.

Erb L., Weisman G.A. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways // Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal. 2012. V.1. № 6. P. 789–803.

Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E.et al. The $P2X_7$ receptor: A key player in IL-1 processing and release // J. Immunol. 2006. V. 176. № 7. P. 3877–3883.

Ferrari D., Bianchi N., Eltzschig H.K. et al. MicroRNAs modulate the purinergic signaling network // Trends Mol. Med. 2016. V. 22. P. 905–918.

Fonseca B., Martinez-Aguila A., De Lara M.J.P. et al. Diadenosine tetraphosphate as a potential therapeutic nucleotide to treat glaucoma // Purinergic Signal. 2017. V. 13. P. 171–177.

Fowler B.J., Gelfand B.D., Kim Y. et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic anti-inflammatory activity // Science. 2014. V. 346. P. 1000–1003.

Franca G.R., Freitas R.C., Ventura A.L. ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture // Int. J. Dev. Neurosci. 2007. V. 25. № 5. P. 283–291.

Franke H., Klimke K., Brinckmann U. et al. P2X(7) receptor-mRNA and -protein in the mouse retina; changes during retinal degeneration in BALBCrds mice // Neurochem. Int. 2005.V. 47. № 4. P. 235–242.

Fries J.E., Wheeler-Schilling T.H., Guenther E. et al. Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004a. V. 45. № 10. P. 3410–3417.

Fries J.E., Wheeler-Schilling T.H., Kohler K. et al. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study // Brain Res. Mol. Brain Res. 2004b. V. 130 P. 1–6.

Gampe K., Haverkamp S., Robson S.C. et al. NTPDase2 and the P2Y1 receptor are not required for mammalian eye formation // Purinergic Signal. 2015. V. 11. № 1. P. 155–160.

Geiger L.K., Kortuem K.R., Alexejun C. et al. Reduced redox state allows prolonged survival of axotomized neonatal retinal ganglion cells // Neuroscience. 2002. V. 109. P. 635–642.

Ghosh M., Aguirre V., Wai K. et al. The interplay between cyclic AMP, MAPK, and NF-κBP at hways in response to proinflammatory signalsin microglia // Biomed. Res. Int. 2015. V. 2015. Article № 308461.

Giuliani A.L., Sarti A.C., Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules // Immunol. Lett. 2019. V. 205. P. 16–24.

Glaser T., Cappellari A.R., Pillat M.M. et al. Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration // Purinergic Signal. 2012. V. 8. P. 523–553.

Gonzalez-Fernandez E., Sanchez-Gomez M.V., Perez-Samartin A. et al. A3 adenosine receptors mediate oligodendrocyte death and ischemic damage to optic nerve // Glia. 2014. V. 62. № 2. P. 199–216.

Greenwood D., Yao W.P., Housley G.D. Expression of the $P2X_2$ receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina // NeuroReport. 1997. V. 8. P. 1083–1088.

Grigoryan E.N., Novikova Y.P., Gancharova O.S. et al. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat eye retinal pigment epithelium and choroid under conditions of long term organotypic cultivation // Adv. Aging Res. 2012. V. 1. P. 31–37.

Gu X., Neric N.J., Crabb J.S. et al. Age-related changes in the retinal pigment epithelium (RPE) // PLoS One. 2012. V. 7. № 6. Article № e38673.

Guha S., Baltazar G.C., Coffey E.E. et al. Lysosomal alkalinization, lipidoxidation, and reduced phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor // FASEB J. 2013. V. 27. P. 4500–4509.

Guzman-Aranguez A., Gasull X., Diebold Y. et al. Purinergic receptors in ocular inflammation // Mediators Inflamm. 2014. V. 2014. Article № 320906.

Heavner W., Pevny L. Eye development and retinogenesis // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. V. 4. Article № a008391.

Ho T., Aplin F.P., Jobling A.I. et al. Localization and possible function of P2X receptors in normal and diseased retinae // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2016. V. 32. P. 509–517.

Hoon M., Okawa H., Santina L.D. et al. Functional architecture of the retina: development and disease // Prog. Retin. Eye Res. 2014. V. 42. P. 44–84.

Hu H., Lu W., Zhang M. et al. Stimulation of the $P2X_7$ receptor kills rat retinal ganglion cells in vivo // Exp. Eye Res. 2010. V. 91. P. 425–432.

Hu S.J., Calippe B., Lavalette S. et al. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1β secretion and photoreceptor neurodegeneration // J. Neurosci. 2015. V. 35. P. 6987–6996.

Illes P., Rubini P. Regulation of neural stem/progenitor cell functions by P2X and P2Y receptors // Neural Regen. *Res.* 2017. V. 12. P. 395–396.

Jabs R., Guentherb E., Marquordt K. et al. Evidence for P2X3, P2X4, P2X5 but not for P2X7 containing purinergic receptors in Müller cells of the rat retina // Mol. Brain Res. 2000. V. 76. P. 205–210.

Jacobson K.A., Muller C.E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors // Neuropharmacology. 2016. V. 104. P. 31–49.

Jung J., JoH. W., Kwon H., Jeong N.Y. ATP release through lysosomal exocytosis from peripheral nerves: the effect of lysosomal exocytosis on peripheral nerve degeneration and regeneration after nerve injury // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. Article № 936891.

Kaneda M., Ishii K., Morishima Y. et al. OFF-cholinergic-pathway-selective localization of P2X2 purinoceptors in the mouse retina // J. Comp. Neurol. 2004. V. 476. № 1. P. 103–111.

Kaneda M., Ishii T., Hosoya T. Pathway-dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina // Eur. J. Neurosci. 2008. V. 28. P. 128–136.

Kim W.S., Weickert C.S., Garner B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease // J. Neurochem. 2008. V. 104. P. 1145–1166.

Kimura A., Namekata K., Guo X. et al. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signalling in retinal degeneration // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 9. Article № 1584.

King A.E., Ackley M.A., Cass C.E. et al. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets // Trends Pharm. Sci. 2006. V. 27. P. 416–425.

Kubo Y., Akanuma S., Hosoya K. Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier // Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. 2018. V. 14. № 5. P. 513–531.

Kur J., Newman E.A. Purinergic control of vascular tone in the retina // J. Physiol. 2013. V. 592. № 3. P. 491–504.

Lazarowski E.R., Sesma J.I., Seminario-Vidal L. et al. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release // Adv. Pharmacol. 2011. V. 61. P. 221–261.

Li F., Jiang D., Samuel M.A. Microglia in the developing retina // Neural Dev. V. 2019. № 14. P. 12.

Lin J.H., Takano T., Arcuino G. et al. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis // Develop. Biol. 2006. V. 302. № 1. P. 356–366.

Linden R., Martins R., Silveira M.S. Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina // Prog. Ret. Eye Res. 2005. V. 24. № 4. P. 457–491.

Liu X.L., Zhou R., Pan Q.-Q. et al. Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates pathologic but not developmental angiogenesis in the mouse retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. № 12. P. 6625–6632.

Liu L., Liu X. Roles of drug transporters in blood-retinal barrier // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1141. P. 467–504.

Liu Y., Wang C., Su G. Cellular signaling in müller glia: Progenitor cells for regenerative and neuroprotective responses in pharmacological models of retinal degeneration // J. Ophthalmol. 2019. V. 2019. Article № 5743109.

Locher K.P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. V. 23. № 6. P. 487–493.

Lu W., Hu H., Sévigny J. et al. Rat, mouse, and primate models of chronic glaucoma show sustained elevation of extracellular ATP and altered purinergic signaling in the posterior eye // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. V. 56. P. 3075–3083.

Mac Nair C.E., Schlamp C.L., Montgomery A.D. et al. Retinal glial responses to optic nerve crush are attenuated in *Bax*-deficient mice and modulated by purinergic signaling pathways // J. Neuroinflammation. 2016. V. 13. Article № 93.

Madelung C.F., Falk M.K., Sorensen T.L. The association between neovascular age-related macular degeneration and regulatory T cells in peripheral blood // Ophthalmol. 2015. V. 9. P. 1147–1154.

Maminishkis A., Jalickee S., Blaug S.A. et al. The P2Y2 receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. V. 43. P. 3555–3566.

Maneu V., Lax P., Cuenca N. Current and future therapeutic strategies for the treatment of retinal neurodegenerative diseases // Neural Regen. Res. 2022. V. 17. № 1. P. 103–104.

Marc R.E. Retinal neurotransmitters // Vis. Neurosci. 2003. V. 85. P. 6187–6191.

Markitantova Y.V., Simirskii V.N. The role of the redox system in initiation of neural eye tissues regenerative response in vertebrates // Rus. J. Dev. Biol. 2020a. V. 51. P. 16–30.

Markitantova Y.V., Simirskii V.N. Inherited eye diseases with retinal manifestations through the eyes of homeobox genes // Int. J. Mol. Sci. 2020b. V. 21. № 5. Article № 1602.

Martins R.A.P., Pearson R.A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate *retina* // Brain Res. 2008. V. 1192. P. 37–60.

Massé K., Dale N. Purines as potential morphogens during embryonic development // Purinergic Signal. 2012. V. 8. P. 503–521.

Massey S.C., O'Brien J.J, Trexler E.B. et al. Multiple neuronal connexins in the mammalian retina // Cell Commun. Adhesion. 2003. V. 10. № 4–6. P. 425–430.

McMurtrey R.J. Multi-compartmental biomaterial scaffolds for patterning neural tissue organoids in models of neurodevelopment and tissue regeneration // J. Tissue Engineering. 2016. V. 7. P. 1–8.

Medrano M.P., Bejarano C.A., Battista A.G. et al. Injury-induced purinergic signalling molecules upregulate pluripotency gene expression and mitotic activity of progenitor cells in the zebrafish retina // Purinergic Signal. 2017. V. 4. P. 443–465.

Mellough C.B., Bauer R., Collin J. et al. An integrated transcriptional analysis of the developing human retina // Development. 2019. V. 146. № 2. Article № dev169474.

Metea M.R., Newman E.A. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 2862–2870.

Meyer C.H., Hotta K., Peterson W.M. et al. Effect of INS37217, a P2Y2 receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. V. 43. P. 3567–3574.

Mitchell C.H. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space // J. Physiol. 2001. V. 534. P. 193–202.

Mitchell C.H., Reigada D. Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE // Purinergic Signal. 2008. V. 4. P. 101–107.

Mishra S.K., Braun N., Shukla V. et al. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation // Development. 2006. V. 133. P. 675–684.

Moran-Jimenez M.J., Matute C. Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system // Brain Res. Mol. Brain Res. 2000. V. 78. P. 50–58.

Nagase K., Tomi M., Tachikawa M. et al. Functional and molecular characterization of adenosine transport at the rat inner blood-retinal barrier // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. № 1. P. 13–19.

Nascimento J.L., Sawada L.A., Oliveira K.R.M. et al. GABA and glutamate transporters: new events and function in the vertebrate retina // Psychol. Neurosci. 2013. V. 6. № 2. P. 145–150.

Niyadurupola N., Sidaway P., Ma N. P2X7 receptor activation mediates retinal ganglion cell death in a human retina model of ischemic neurodegeneration // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. P. 2163–2170.

Notomi S., Hisatomi T., Murakami Y. et al. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage // PLoS One. 2013. V. 8. Article № e53338.

Nunes P.H., Calaza K.C., Albuquerque L.M. et al. Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina // Int. J. Dev. Neurosci. 2007. V. 25. № 8. P. 499–508.

Olivier E., Dutot M., Regazzetti A. et al. P2X7-pannexin-1 and amyloidβ-induced oxysterol input in human retinal cell: role in age-related macular degeneration? // Biochimie. 2016. V. 127. P. 70–78.

Oh J., Smiddy W.E., Kim S.S. Antiplatelet and anticoagulation therapy in vitreoretinal surgery // Am. J. Ophthalmol. 2011. V. 151. № 6. P. 934–939.

Ohnuma S., Harris W.A. Neurogenesis and the cell cycle // Neuron. 2003. V. 40. № 2. P. 199–208.

Ornelas I.M., Silva T.M., Fragel-Madeira L. et al. Inhibition of PI3K/Akt pathway impairs G2/M transition of cell cycle in late developing progenitors of the avian embryo retina // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. Article № e53517.

Pannicke T., Frommherz I., Biedermann B. et al. Differential effects of P2Y1 deletion on glial activation and survival of photoreceptors and amacrine cells in the ischemic mouse retina // Cell Death Dis. 2014. V. 5. № 7. Article № e1353.

Pearson R., Catsicas M., Becker D. et al. Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone // J. Neurosci. 2002. V. 22. P. 7569–7579.

Pearson R.A., Dale N., Llaudet E. et al. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation // Neuron. 2005. V. 46. № 5. P. 731–744.

Pequignot M.O., Provost C., Salle S. et al. The retinal pigment epithelium undergoes massive apoptosis during early differentiation and pigmentation of the optic cup // Mol. Vis. 2011. V. 17. P. 989–996.

Perron M., Kanekar S., Vetter M.L. et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye // Dev. Biol. 1998. V. 199. P. 185–200.

Pintor P., Sánchez-Nogueiro J., Irazu M. et al. Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye // Purinergic Signal. 2004. V. 1. P. 83–90.

Pirvu A.S., Andrei A.M., Stanciulescu A.C. NAD^+ metabolism and retinal degeneration // Exp. Ther. Med. 2021. V. 22. № 1. Article № 670.

Potucek Y.D., Crain J.M., Watters J.J. Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression // Neurochem. Int. 2006. V. 49. № 2. P. 204–214.

Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L. et al. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina // Eur. J. Neurosci. 1991. V. 3. P. 559–569.

Puthussery T., Fletcher E.L. Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina // J. Comp. Neurol. 2004. V. 472. № 1. P. 13–23.

Puthussery T., Fletcher E.L. P2X2 receptors on ganglion and amacrine cells in cone pathways of the rat retina // J. Comp. Neurol. 2006. V. 496. P. 595–609.

Puthussery T., Yee P., Vingrys A.J. et al. Evidence for the involvement of purinergic P2X7 receptors in outer retinal processing // Eur. J. Neurosci. 2006. V. 24. P. 7–19.

Quazi F., Molday R.S. ATP-binding cassette transporter ABCA4 and chemical isomerization protect photoreceptor cells from the toxic accumulation of excess 11-cis-retinal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 13. P. 5024–5029.

Ramachandra R.S., Fliesler S.J. Cholesterol homeostasis in the vertebrate retina: biology and pathobiology // J. Lipid Res. 2021. V. 62. Article № 100057.

Raymond P.A., Barthel L.K., Bernardos R.L. et al. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish // BMC Dev. Biol. 2006. V. 6. Article № 36.

Reichenbach A., Bringmann A. Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration // Neuropharmacology. 2016. V. 104. P. 194–211.

Resta V., Novelli E., Vozzi G. et al. Acute retinal ganglion cell injury caused by intraocular pressure spikes is mediated by endogenous extracellular ATP // Eur. J. Neurosci. 2007. V. 25. № 9. P. 2741–2754.

Ricatti M.J., Battista A.G., Zorrilla Z.M. et al. Purinergic signals regulate daily S-phase cell activity in the ciliary marginal zone of the zebrafish retina // J. Biol. Rhythms. 2011. № 2. P. 107–117.

Rosenberg S.S., Spitzer N.C. Calcium signaling in neuronal development // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. № 10. Article № a004259.

Sakamoto K., Endo K., Suzuki T. et al. P2X7 receptor antagonists protect against N-methyl-D-aspartic acid-induced neuronal injury in the rat retina // Eur. J. Pharmacol. 2015. V. 756. P. 52–58.

Sanches G., de Alencar L.S., Ventura A.L. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade // Int. J. Dev. Neurosci. 2002. V. 20. P. 21–27.

Sanderson J., Dartt D.A., Trinkaus-Randall V. et al. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Müller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland // Exp. Eye Res. 2014. V. 127. P. 270–279.

Santiago A.R., Baptista F.I., Santos P.F. et al. Role of Microglia adenosine A2A receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases // Mediators Inflamm. 2014. V. 2014. Article № 465694.

Schacher S., Wu F., Sun Z.Y. Pathway-specific synaptic plasticity: activity-dependent enhancement and suppression of long-term heterosynaptic facilitation at converging inputs on a single target // J. Neurosci. 1997. V. 17. № 2. P. 597–606.

Seitz R., Ohlmann A., Tamm E. The role of Müller glia and microglia in glaucoma // Cell Tissue Res. 2013. V. 353. № 2. P. 339–345.

Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 10. P. 3987–3993.

Sinha T., Naash M.I., Al-Ubaidi M.R. The symbiotic relationship between the neural retina and retinal pigment epithelium is supported by utilizing differential metabolic pathways // iScience. 2020a. V. 23. № 4. Article № 101004.

Sinha T., Naash M.I., Al-Ubaidi M.R. Flavins act as a critical liaison between metabolic homeostasis and oxidative stress in the retina // Front. Cell Dev. Biol. 2020b. V. 27. № 8. Article № 861.

Sholl-Franco A., Fragel-Madeira L., Macama A.C. et al. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina // Int. J. Dev. Neurosci. 2010. V. 28. № 1. P. 63–73.

Spinozzi E., Baldassarri C., Acquaticci L. et al. Adenosine receptors as promising targets for the management of ocular diseases // Med. Chem. Res. 2021.V. 30. P. 353–370.

Stacy R.C., Wong R.O.L. Developmental relationship between cholinergic amacrine cell processes and ganglion cell dendrites of the mouse retina // J. Comparative Neurol. 2003. V. 456. P. 154–166.

Sugioka M., Fukuda Y., Yamashita M. Ca^{2+} responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina // J. Physiol. 1996. V. 493. P. 855–863.

Sugioka M., Zhou W.L., Hofmann H.D. et al. Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo // Int. J. Dev. Neurosci. 1999. V. 17. P. 135–144.

Sugiyama T., Oku H., Shibata M. et al. Involvement of P2X7 receptors in the hypoxia-induced death of rat retinal neurons // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. № 6. P. 3236–3243.

Sugiyama T. Role of P2X7 receptors in the development of diabetic retinopathy // World J. Diabetes. 2014. V. 5. P. 141–145.

Swarup A., Samuels I.S., Bell B.A. et al. Modulating GLUT1 expression in retinal pigment epithelium decreases glucose levels in the retina: impact on photoreceptors and Muller glial cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2019. V. 316. P. 121–133.

Tagami M., Kusuhara S., Honda S. et al. Expression of ATP-binding cassette transporters at the inner blood-retinal barrier in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy // Brain Res. 2009. V. 1283. P. 186–193.

Tarallo V., Hirano Y., Gelfand B.D. et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88 // Cell. 2012. V. 149. P. 847–859.

Tian L., Kazmierkiewicz K.L., Bowman A.S. Transcriptome of the human retina, retinal pigmented epithelium and choroid // Genomics. 2015. V. 105. P. 253–264.

Tomi M., Hosoya K. The role of blood-ocular barrier transporters in retinal drug disposition: an overview // Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. 2010. V. 6. № 9. P. 1111–1124.

Traba J., Satrustegui J., del Arco A. Adenine nucleotide transporters in organelles: novel genes and functions // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 1183–1206.

Tsukamoto Y. Morphological survey from neurons to circuits of the mouse retina // Meth. Mol. Biol. 2018. V. 1753. P. 3–25.

Tsybovsky Y., Molday R.S., Palczewski K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: Structural and functional properties and role in retinal disease // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 703. P. 105–125.

Uckermann O., Wolf A., Kutzera F. et al. Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide // J. Neurosci. Res. 2006. V. 83. P. 538–550.

Vecino E., Rodriguez F.D., Ruzafa N. et al. Glia–neuron interactions in the mammalian retina // Prog. Ret. Eye Res. 2016. V. 51. P. 1–40.

Ventura A.L.M., Santos-Rodrigues A.D., Mitchell C.H. et al. Purinergic signaling in the retina: From development to disease // Brain Res. Bull. 2019. V. 151. P. 92–108.

Verkhratsky A., Burnstock G. Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance // Bio Essays. 2014. V. 36. № 7. P. 697–705.

Vessey K.A., Fletcher E.L. Rod and cone pathway signalling is altered in the P2X7 receptor knock out mouse // PLoS One. 2012. V. 7. № 1. Article № e29990.

Voelgyi B., Deans M.R., Paul D.L. et al. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 49. P. 11182–11192.

Voigt J., Grosche A., Vogler S. et al. Nonvesicular release of ATP from rat retinal glial (Müller) cells is differentially mediated in response to osmotic stress and glutamate // Neurochem. Res. 2015. V. 40. № 4. P. 651–660.

Wan W., Cui D., Yang X. et al. Expression of adenosine receptors in human retinal pigment epithelium cells *in vitro* // Chin. Med. J. (Engl.). 2011. V. 124. № 8. P. 1139–1144.

Wang J.C.-C., Harris W.A. The role of combinational coding by homeodomain and bHLH transcription factors in retinal cell fate specification // Dev. Biol. 2005. V. 285. P. 101–115.

Ward M.M., Puthussery T., Vessey K.A. et al. The role of purinergic receptors in retinal function and disease // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 664. P. 385–391.

Wehrwein E., Thompson S.A., Coulibaly S.F. et al. Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. V. 45. № 5. P. 1531–1543.

Weick M., Wiedemann P., Reichenbach A. et al. Resensitization of P2Y receptors by growth factor–mediated activation of the phosphatidylinositol-3 kinase in retinal glial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. V. 46. P. 1525–1532.

Wheeler-Schilling T.H., Marquordt K., Kohler K. et al. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells // Brain Res. Mol. Brain Res. 2001. V. 92. P. 177–180.

Wu D.M., Kawamura H., Sakagami K. et al. Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. V. 284. № 6. P. 2083–2090.

Wurm A., Erdmann I., Bringmann A. et al. Expression and function of P2Y receptors on Muller cells of the postnatal rat retina // Glia. 2009. V. 57. P. 1680–1690.

Xia J., Lim J.C., Lu W. et al. Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X7 receptors // J. Physiol. 2012. V. 590. № 10. P. 2285–2304.

Xu H., Tian N. Glycine receptor-mediated synaptic transmission regulates the maturation of ganglion cell synaptic connectivity // J. Comp. Neurol. 2008. V. 509. № 1. P. 53–71.

Yang D., Chen J. The P2X7 receptor in AMD // Austin. J. Clin. Ophthalmol. 2014. V. 1. № 3. 1012.

Yegutkin G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783. № 5. P. 673–694.

Zhang X., Zhang M., Laties A.M. et al. Balance of purines may determine life or death of retinal ganglion cells as A3 adenosine receptors prevent loss following P2X7 receptor stimulation // J. Neurochem. 2006. V. 98. № 2. P. 566–575.

Zhang S., Li H., Li B. et al. Adenosine A1 receptors selectively modulate oxygen-induced retinopathy at the hyperoxic and hypoxic phases by distinct cellular mechanisms // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. V. 56. № 13. P. 8108–8119.

Zhang X., Alhasani R.H., Zhou X. et al. Oxysterols and retinal degeneration // Br. J. Pharmacol. 2021. Jan 27. [Online ahead of print]. https://doi.org/10.1111/bph.15391

Zhong Y., Yang Z., Huang W. C. et al. Adenosine, adenosine receptors and glaucoma: an updated overview // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. P. 2882–2890.

Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases // Purinergic Signal. 2012. V. 8. № 3. P. 437–502.

Role of Purinergic Signaling System in Controlling of the Retinal Histogenesis, Homeostasis and Pathogenesis in Vertebrates

Yu. V. Markitantova[1], * and V. N. Simirskii[1], **

[1]*Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, ul. Vavilov 26, Moscow, 119334 Russia*

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

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

Purinergic signaling (PS) occupies an important place in the mechanisms of regulation of cellular processes in the vertebrate retina development. PS maintains retinal homeostasis, being associated with other endogenous regulatory systems. Signaling cascades with the participation of PS components can play a dual role in the vertebrate retina: they provide both damage and protective effects that are largely determined by conditions of the cells microenvironment and by molecular-genetic context. The taxon-specific differences are determined genetically and metabolically, in the effects of the PS in retinal cells, in addition to general regularities. Identification of the key molecular components that bind the PS with other regulatory systems creates the prerequisites for the selection of specific cells and molecular targets for the neuroprotection of human retina with eye pathologies.

Keywords: vertebrates, retina, retinal pigment epithelium, differentiation, proliferation, purinergic signaling, signaling pathways, neurodegeneration, neuroprotection