

Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 51 № 6 2020 НОЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Журнал основан в 1970 году академиком Б.Л. Астауровым

Выходит 6 раз в год

ISSN: 0475-1450

*Журнал издается под руководством
Отделения биологических наук РАН*

Главный редактор

А.В. Васильев

Редакционная коллегия:

И.И. Адамейко, Ю.Д. Богданов, И.Ю. Баклушинская (*зам. гл. редактора*),
Е.С. Васецкий (*зам. гл. редактора*), **С.Г. Васецкий**, О.А. Гусев,
В.Е. Дьяконова, Т.А. Ежова, Г.Н. Ениколопов, А.В. Ересковский,
А.Г. Зарайский, Ю.А. Краус (*отв. секретарь*), Р.П. Костюченко,
Г.С. Левит, В.С. Михайлов, Н.Д. Озернюк, Г.Е. Онищенко,
Д.В. Онишук, М.В. Ремизова, С.В. Рожнов,
О.Л. Серов, А.Н. Томилин

Редакционный совет:

М.А. Александрова, В.Я. Бродский, Скотт Гилберт,
В.А. Голиченков, Э.Н. Григорян, С.М. Закиян, И.С. Захаров,
В.Б. Иванов, А.М. Куликов, И.В. Лядова, А.В. Марков,
А.М. Оловников, О.Б. Симонова, Д.А. Сахаров,
О.Г. Строева, В.С. Тарабыкин, М.В. Угрюмов, Н.П. Шарова

Адрес редакции: 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: ontogenez@list.ru

Зав. редакцией Е.Д. Гасило

Москва

ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

Оригинал-макет подготовлен ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

© Российская академия наук, 2020

© Редколлегия журнала “Онтогенез”
(составитель), 2020

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-66702 от 28 июля 2016 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 01.12.2019 г.
Тираж 24 экз.

Формат 60 × 88¹/₈
Зак. 2811

Уч.-изд. л. 9.75
Бесплатно

Усл. печ. л. 9.53

Учредитель: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский пр., 14
Исполнитель по госконтракту № 4У-ЭА-037-19 ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»,
117342, Москва, ул. Бутлерова 17Б, а/я 47

Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коныхин А.В.),
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+

СОДЕРЖАНИЕ

Том 51, номер 6, 2020

ОБЗОРЫ

- Гистоновые шапероны семейства NAP: характеристика и роль в онтогенезе
А. А. Акишина, Е. Е. Куваева, Ю. Е. Воронцова, О. Б. Симонова 403
- Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих
*С. В. Раннева, Е. Ю. Брусенцев, Т. Н. Игонина, Д. С. Рагаева,
И. Н. Рожкова, Н. И. Ершов, А. Л. Левинсон, С. Я. Амтиславский* 417
-

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

- Раннее появление признаков старения в ретинальном пигментном эпителии
у молодых крыс альбиносов
Ю. П. Новикова, Э. Н. Григорян 440
-

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

- Взаимосвязь голоплоидного содержания ДНК с жизненной формой
и продолжительностью жизненного цикла растений
Н. Ф. Лунькова, Н. В. Жуковская, В. Б. Иванов 450
- Морфогенез рассеченного листа березы в культуре *in vitro*
О. С. Машкина, Т. М. Табацкая 460
-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Создание клеточной модели для изучения взаимодействия промотора
гена *Pou5f1 (Oct4)* с генетическим окружением
*А. А. Кузьмин, В. В. Ермакова, Е. В. Потапенко,
М. Г. Островерхова, Н. А. Гурьев, А. Н. Томили* 473
-

ПОТЕРИ НАУКИ

- Сергей Григорьевич Васецкий (1935–2020) 479
-
-

Contents

Vol. 51, No. 6, 2020

REVIEWS

- NAP Family Histone Chaperones: Characterization and Role in Ontogenesis
A. A. Akishina, E. E. Kuvaeva, Y. E. Vorontsova, and O. B. Simonova 403
- In Vitro* Culture of Preimplantation Embryos and Its Influence on Mammalian Ontogenesis
*S. V. Ranneva, E. Yu. Brusentsev, T. N. Igonina, D. S. Ragaeva, I. N. Rozhkova,
N. I. Ershov, A. L. Levinson, and S. Ya. Amstislavsky* 417
-

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

- Early Appearance of Aging Signs in Retinal Pigment Epithelium in Young Albino Rats
Yu. P. Novikova and E. N. Grigoryan 440
-

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

- Relationship of the Holoploid DNA Content with the Life Form and Duration
of the Life Plant Cycle
N. F. Lunkova, N. V. Zhukovskaya, and V. B. Ivanov 450
- Morphogenesis of a Dissected Birch Leaf *in vitro* Culture
O. S. Mashkina and T. M. Tabatskaya 460
-

BRIEF COMMUNICATIONS

- Establishing a Cell Model for Studying the Interaction of the *Pou5f1* (*Oct4*)
Promoter with the Genetic Environment
*A. A. Kuzmin, V. V. Ermakova, E. V. Potapenko,
M. G. Ostroverkhova, N. A. Guriev, and A. N. Tomilin* 473
-

LOSSES OF SCIENCE

- Sergei Grigorievich Vassetzky (1935–2020) 479
-
-

УДК 577.21

ГИСТОНОВЫЕ ШАПЕРОНЫ СЕМЕЙСТВА NAP: ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. А. А. Акишина^{а, #}, Е. Е. Куваева^{а, #}, Ю. Е. Воронцова^а, О. Б. Симонова^{а, *}^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2020 г.

После доработки 10.06.2020 г.

Принята к публикации 15.06.2020 г.

Гистоновые шапероны – это класс белков, которые связывают и транспортируют гистоны, предотвращая их хаотичное агрегирование при образовании нуклеосом. Гистоновые шапероны семейства NAP (Nucleosome Assembly Protein) содержат высоко консервативный центральный домен NAP, необходимый для связывания гистонов и сборки нуклеосом. Они являются неотъемлемым компонентом в создании и поддержании динамики эукариотического хроматина, от которой зависит транскрипция многих генов. В обзоре рассматривается семейство белков NAP и его конкретные представители: NAP1, NAP2 и CG5017/Hanabi. Будучи каноническими переносчиками гистонов, и обеспечивая эффективный ремоделинг хроматина, белки семейства NAP участвуют в нейрональной дифференцировке, сперматогенезе и формировании долговременной памяти, что указывает на важность этого семейства в онтогенезе.

Ключевые слова: гистоновые шапероны, нуклеосомы, хроматин, онтогенез

DOI: 10.31857/S0475145020060026

ВВЕДЕНИЕ

Сборка и разборка хроматина – это динамический биологический процесс, который обуславливается конформационной подвижностью нуклеосом. Благодаря ему осуществляется доступность эукариотического генома для репликации, транскрипции, репарации ДНК и клеточного цикла. Основной структурной единицей эукариотического хроматина является нуклеосома, в которой нить ДНК длиной 146 п.н. обернута вокруг гистонового октамера, состоящего из двух тетрамеров – каждый из которых складывается из гистоновых белков H2A, H2B, H3 и H4 (Luger et al., 1997; Hammond et al., 2017).

Сборка хроматина представляет собой поэтапный процесс, который начинается с присоединения гистонового тетрамера (H3-H4)₂ к ДНК и последующим включением димеров H2A-H2B для образования нуклеосомы. В физиологических условиях гистоны и ДНК не способны самостоятельно собираться в нуклеосомы. Гистоновые шапероны – это класс белков, которые связывают гистоны, предотвращая формирование неспецифических агрегатов при образовании нуклеосомной частицы. Они являются ключевыми элементами, участвующими в поддержании стабильности и

динамики гистоновых белков в клетке. Разнообразные структурные мотивы и олигомерные состояния обеспечивают электростатические и конформационно-специфические взаимодействия между контактными поверхностями гистонов и гистоновыми шаперонами, что приводит к перемещению последних от одного гистона к другому (“туда-обратно”) и упорядочиванию процесса сборки и разборки нуклеосом. Ковалентные модификации сдвигают гистон-связывающее равновесие шаперонов в сторону тех или иных партнеров до тех пор, пока не будет достигнуто наиболее стабильное состояние – собранная и позиционированная нуклеосома. Таким образом, гистоновые шапероны играют важную роль, обеспечивая эффективность процессов сборки и разборки нуклеосом, замещая гистоны новыми каноническими или вариантными формами. К таким шаперонам относят антисайленсинговый фактор 1 (Asf1), гистоновый регулятор (HIR), фактор сборки хроматина 1 (CAF-1), белки сборки нуклеосом (NAP – Nucleosome Assembly Protein) и др. (Elsässer, D’Arcy, 2012; Mattioli et al., 2015; Valieva et al., 2016).

В последнее время накапливаются факты о разнообразии функций гистоновых шаперонов, которое они приобрели в ходе эволюции (Okuwaki et al., 2010). Однако основной функцией белков семейства NAP остается их контакт с гистоновыми

[#] Равный вклад авторов.

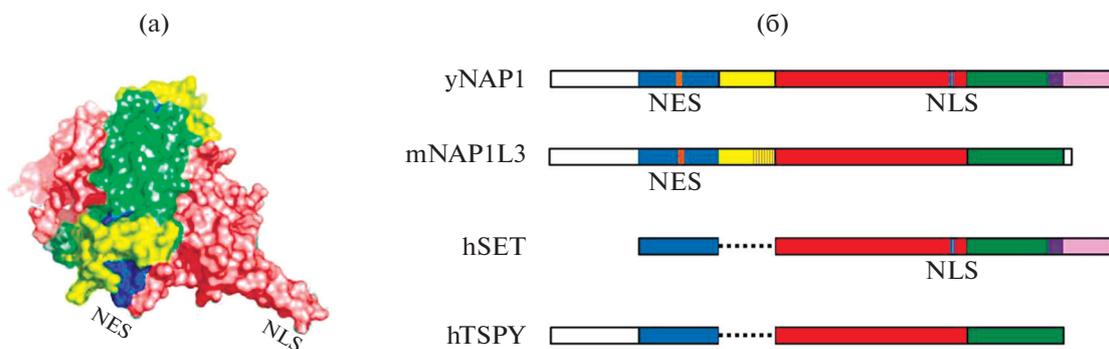


Рис. 1. Структурная организация белков семейства NAP и домена NAP. (а) Модель третичной структуры (контактная поверхность) дрожжевого NAP1. Субдомены А, В, С и D представлены в синем, желтом, красном и зеленом цветах соответственно. (б) Доменная организация членов семейства NAP: дрожжей – yNAP1, мыши – mNAP1L3 и человека – hSET и hTSPY. Фиолетовым цветом указано положение кислого С-концевого домена. Повторяющийся мотив у mNAP1L3 является частью субдомена В и обозначен штриховкой. Пунктирной линией обозначено отсутствие субдомена В. NES – последовательность ядерного экспорта, NLS – последовательность ядерной локализации.

ми димерами H2A-H2B, в результате чего обеспечивается правильная сборка и разборка базовых частиц нуклеосом. Недавно в бесклеточной системе было показано, что NAP1 мыши участвует в генерировании интермедиатных частиц – гекса-сом, вытесняя из нуклеосомы один из димеров H2A-H2B, содержащий убиквитинилированный гистон H2B (Krajewski, 2020). Кроме того, в последнее время особый интерес вызывает вовлеченность белков семейства NAP в процессы развития нервной системы (Qiao et al., 2018), поддержания пролиферации гемопоэтических стволовых клеток (Heshmati et al., 2018) у животных и развития различных органо-тканевых структур у растений (Zhou et al., 2015; Zhu et al., 2017; Varma et al., 2018). Понимание связи между разнообразием белков семейства NAP и специфичностью их взаимодействия с основными и вариантными гистонами важно для изучения ключевых клеточных процессов. Обзор посвящен характеристике семейства белков гистоновых шаперонов NAP (Nucleosome Assembly Protein) и его отдельным представителям – NAP1, NAP2 и CG5017.

СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ NAP (NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN)

В семейство NAP входят белки, содержащие высоко консервативный центральный домен NAP, состоящий примерно из 300 аминокислот. Основной функцией этого домена является связывание гистонов. В работе, посвященной описанию структуры дрожжевого белка NAP1 (yNAP1), дана характеристика домена NAP (Park, Luger, 2006). Этот белок имеет два домена. Домен I состоит из протяженной α -спирали, фланкированной двумя короткими α -спиралями. Он отвечает за димеризацию. Главной структурной особенностью домена II (домен взаимодействия с белками) является β -слой, со-

стоящий из четырех антипараллельных β -цепей, который прикрыт α -спиралями с нижней стороны. В структуре этого домена присутствует небольшой выступающий участок, состоящий из антипараллельной β -шпильки – сайта ядерной локализации NLS (nuclear localization sequence) (Mosammarparast, 2002). Каждый домен поделен на два субдомена: А (домен I), В (домен I), С (домен II) и D (домен II). Субдомен А (показан синим цветом на рис. 1) представляет собой α -спираль, на конце которой находится последовательность NES (nuclear export sequence), отвечающая за ядерный экспорт (рис. 1). Далее следует субдомен В, контролирующий доступ к NES. Субдомен С формирует амфипатический β -слой, который снизу защищается субдоменом D.

Отличительной чертой подсемейства NAP1 является кислый С-концевой домен (рис. 1б), необходимый для кратковременного вытеснения димеров H2A/H2B, что обеспечивает скольжение нуклеосом. Несмотря на варьирующий размер и непостоянное присутствие, С-концевой домен белков разных подсемейств имеет консервативный аминокислотный состав. Так у белков подсемейства SET кислый С-концевой домен есть; у белков других подсемейств NAP он иногда присутствует, но его длина варьируется, например, у NAP1L5 он короче, а у NAP1L3 и TSPY он практически отсутствует. Предполагают, что именно кислый С-концевой домен способствует контакту белков NAP с гистонами (Park, Luger, 2006; Liu et al., 2019).

Длина аминокислотной последовательности субдомена В является наиболее варибельной частью у разных белков. Этот домен у yNAP1 Парк и Лагер (Park, Luger, 2006) обозначили как домен “доступности” к NES (accessory domain), или “дополнительный” домен, поскольку он иногда отсутствует у других представителей семейства NAP. Тем

Семейство NAP

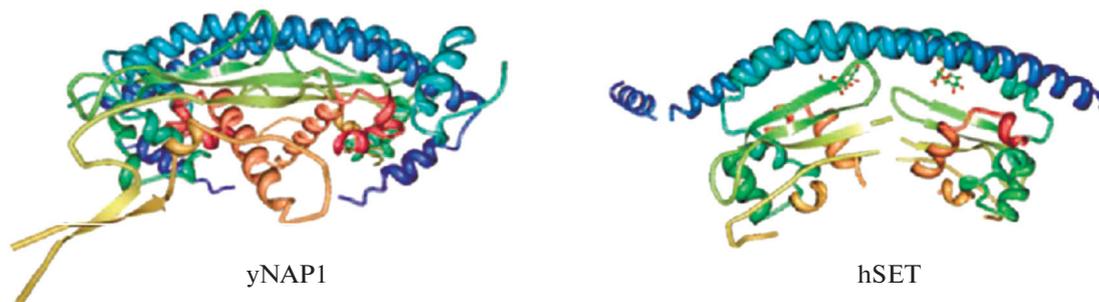


Рис. 2. Структура “наушники” димеров гистоновых шаперонов: дрожжевого yNAP1 (слева) и hSET человека (справа).

не менее, Парк и Лагер предположили, что субдомен В может обеспечить свободный доступ к NES и ядерный экспорт или, наоборот, может маскировать NES, предотвращая перенос белка NAP1 из ядра в цитоплазму. Полностью принять эту гипотезу затрудняет факт того, что у белков SET субдомен В отсутствует. В специфичном для мозга белке NAP1L3 длина субдомена В составляет примерно 181 аминокислотных остатков (рис. 1б). У NAP1L3 субдомен В содержит повторяющийся мотив неизвестной функции, первоначально идентифицированный в белке нейрофиламента Н (NF-H) (Shen et al., 2001). Эти различия в последовательностях, вероятно, определяют специфические функции белков семейства NAP.

У разных организмов члены белкового семейства NAP были идентифицированы по наличию домена NAP на основании сравнительного анализа гомологии последовательностей, но без учета выполняемых ими функций. Поэтому классификация “NAP”-белков остается запутанной. Для дрожжей характерен один член семейства – NAP1, высшие эукариоты, как правило, имеют несколько гомологов NAP1. Семейство NAP можно разбить на подсемейства: NAP1, транслокация SE (SET), NAP1-подобные белки (NAP1L), семенник-специфичные белки Y (TSPY) и специфичные для семенников Y-подобные белки (TSPYL) (von Lindern et al., 1992; Schnieders et al., 1996; Vogel et al., 1998; Attia et al., 2013).

SET – консервативные белки семейства NAP, включают белки дрозофилы и человека. Кристаллическая структура SET, состоящая из N-концевой спирали, основной спирали (backbone helix) и домена “earmuff”, который отвечает за формирование димера, формирующего структуру, напоминающую наушники, сходную со структурой димеров NAP1 (рис. 2). Белки NAP1 и дрожжевой белок Vps75 (гомолог SET, идентифицирован сначала как белок подсемейства NAP1) сходны с SET по доменной структуре и по способности специфически связываться с гистонами. В ре-

зультате тщательного анализа было показано, что SET и NAP1-белки относятся к гистоновым шаперонам. Одни могут формировать комплексы с гистоновыми ацетилтрансферазами (Vps75), другие – с гистоновыми деацетилазами (Nap1). SET является компонентом белкового комплекса INHAT, участвующего в процессе ингибирования гистоновых ацетилтрансфераз (Eitoku et al., 2008; Moshkin et al., 2009; Das et al., 2010).

Среди функций SET – участие в функционировании гистонов, взаимодействие с ДНК-связывающими факторами и протеазами, а также регуляция транскрипции, обеспечение стабильности мРНК и участие в процессе апоптоза (Kawase et al., 1996; Brennan, Stetev, 2001; Fan et al., 2003; Gamble et al., 2005; Haruki et al., 2006). В основе многофункциональности белка SET лежит его значимость в сборке и разборке нуклеосом. Также согласно недавним исследованиям SET участвует в вытеснении линкерного гистона H1, способствуя декомпактизации хроматина, формированию преинициаторного комплекса в районе промотора гена и инициации транскрипции. Все эксперименты проводили *in vitro*, тем не менее, предполагают, что белки SET служат важными регуляторами активации генов и *in vivo* (Zhang et al., 2015).

TSPY был идентифицирован как член семейства NAP главным образом на основании гомологии аминокислотных последовательностей. Предполагается, что TSPY выполняет функцию, связанную с пролиферацией сперматогониев (Schnieders et al., 1996), но его конкретная роль в клетке не была охарактеризована. Последующая идентификация многих специфичных для семенников Y-подобных белков (TSPYL, TSPYL4) (Ozbun et al., 2001) и продуктов альтернативного сплайсинга (TSPY-S и TSPY-L) в других тканях говорит о том, что функции TSPY тканеспецифичны (Ozbun et al., 2001; Krick et al., 2003; Puffenberger et al., 2004). Результаты некоторых исследований показали, что TSPY активирует гены, контролируемые клеточ-

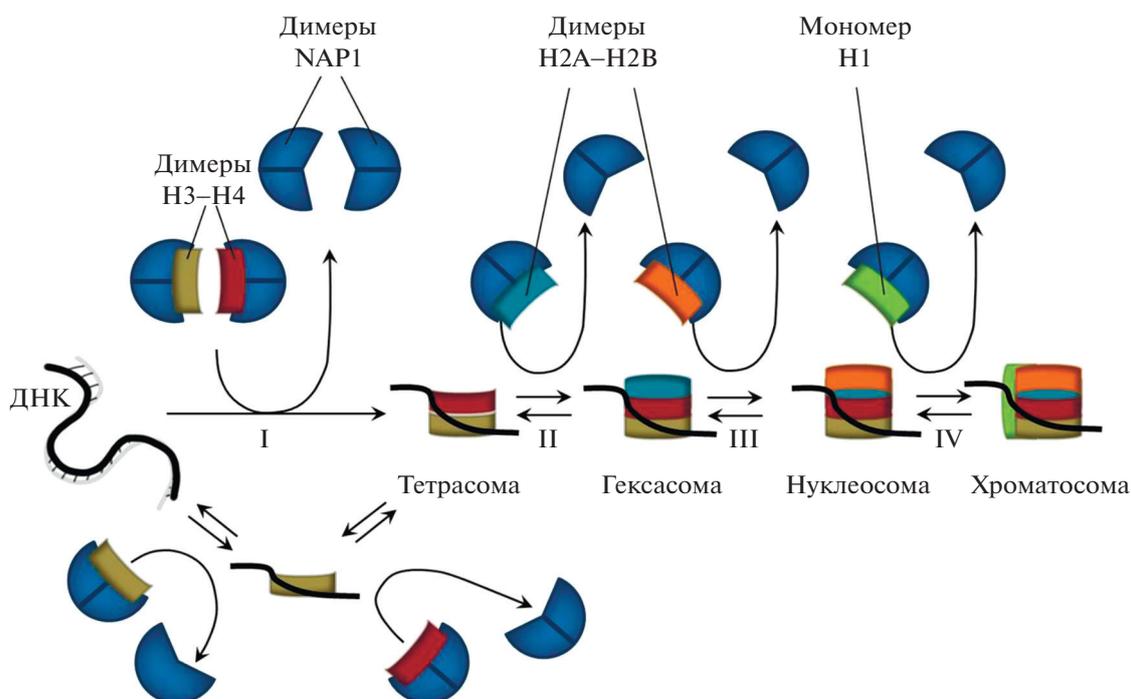


Рис. 3. Механизм ступенчатой сборки нуклеосом, с участием NAP1. Первый этап (I) сборки нуклеосомы заключается в связывании двух комплексов $\text{NAP1}_2(\text{H3-H4})$ с ДНК, вследствие чего, формируется частица тетрасомы и два свободных димера NAP1. Второй этап (II) заключается в том, что тетрасомная частица взаимодействует с комплексом $\text{NAP1}_2(\text{H2A-H2B})$, образуется гексасомная частица и димер NAP1. На третьем этапе (III) происходит увеличение гексасомы до нуклеосомы при помощи еще одного комплекса $\text{NAP1}_2(\text{H2A-H2B})$, в итоге получается полная нуклеосома и свободный димер NAP1. Четвертый, но не обязательный этап (IV) — это добавление в нуклеосому линкерного гистона H1.

ный цикл и жизнеспособность клеток, и подавляет гены, контролируемые апоптоз (Kido, Lau, 2019).

Экспрессия белков NAP высокоспецифична для многих типов клеток и тканей (Kellogg et al., 1995; Hu et al., 1996; Zhou et al., 2015). Известно, что белки семейства NAP через ремоделирование структуры хроматина участвуют в разнообразных клеточных событиях, они регулируют экспрессию генов на эпигенетическом уровне, смещая гистоны, открывая тем самым доступ регуляторным факторам к местам связывания на ДНК (Kellogg et al., 1995; Compagnone et al., 2000; Chai et al., 2001; Canela et al., 2003; Oram et al., 2006; Okuwaki et al., 2010; Moshkin et al., 2013; Zhou et al., 2016).

Поскольку белки семейства NAP вовлечены во множество жизненно важных для организма процессов, рассмотрим подсемейства NAP1 и NAP1-подобных белков подробнее.

Подсемейство NAP1

Первоначально NAP1 был идентифицирован у *Xenopus laevis* как кислый белок, который участвует в сборке нуклеосом (Laskey et al., 1978). Поскольку NAP1 является одним из самых первых

исследованных представителей семейства NAP, его структура взята за образец.

NAP1 является консервативным белком у всех эукариот, от дрожжей до человека (Ishimi et al., 1983; Ishimi, Kikuchi, 1991; Ito et al., 1996; Steer et al., 2003) и, кроме участия в процессах, отвечающих за сборку хроматина, выполняет множество других функций *in vivo*.

Дрожжевой NAP1 (возможно, наиболее охарактеризованный из всех гомологов NAP1) представляет собой полипептид с молекулярной массой 48 кДа, который связывает гистоны H2A-H2B, H3-H4 и линкерный гистон H1 и может обеспечивать сборку нуклеосом *in vitro* и *in vivo* (рис. 3) (Ishimi, Kikuchi, 1991; McBryant et al., 2003; Kepert et al., 2005; Aguilar-Gurreri et al., 2016). Структурный и функциональный анализ центрального домена уNAP1 (с 74 по 365 аминокислотный остаток) показал, что именно эта область сохраняет нативную структуру и функционирует при сборке нуклеосом (Fujii-Nakata et al., 1992; McBryant et al., 2003).

В клетках HeLa NAP1 взаимодействует с вновь синтезированными гистонами H2A и H2B, что указывает на его участие в сборке хроматина *de novo* (Chang et al., 1997).

Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что NAP1 обладает способностью удалять димеры H2A-H2B из нуклеосом и заменять их либо основными типами димеров, либо альтернативными димерами — H2A.X-H2B, H2A.Z-H2B или макро-H2A1.2-H2B (Park et al., 2005; Chen et al., 2016). Также в бесклеточной системе было показано, что NAP1 стабилизирует гексасомы — функционально-активные интермедиаты нуклеосом, содержащие только один димер H2A-H2B. Особенно сильно это проявляется в случае убиквитинирования гистона H2B, которое существенно увеличивает мобильность димеров H2A-H2B даже в отсутствие ремоделирующих хроматин комплексов и положительно влияет на процесс элонгации транскрипции (Krajewski, 2020).

Таким образом, NAP1 участвует как в репликативной, так и в независимой от репликации сборке хроматина, обеспечивая скольжение нуклеосом вдоль ДНК, которое происходит в следствие динамического обмена гистоновых димеров (Park et al., 2005). В результате такого скольжения открывается или закрывается доступ к регуляторным элементам (промоторы, энхансеры, сайленсеры и т.п.), которые влияют на транскрипционный статус соседних генов (Kawase et al., 1996; Ito et al., 2000; Shikama et al., 2000). Так общегеномный анализ, проведенный на дрожжевом штамме с дефицитом экспрессии *Nap1* у *Saccharomyces cerevisiae*, показал нарушение экспрессии 10% всех генов (Ohkuni et al., 2003). У мышей нокаутинг нейрон-специфического гена *Nap1l2* (представитель семейства NAP1-подобных белков) приводило к эмбриональной летальности примерно на средней стадии беременности (Rodriguez et al., 1997).

NAP1 может не только связывать гистоны и участвовать в сборке нуклеосом, регулируя транскрипцию, он также задействован в регуляции клеточного цикла. Например, дрожжевой NAP1 специфически взаимодействует с регуляторами митоза: циклинами типа B (*clb2*), киназой *Gin4* и NBP (NAP1 связывающий белок) (Kellogg, Murray, 1995; Altman, Kellogg, 1997; Shimizu et al., 2000; Mortensen et al., 2002). Ядерно-цитоплазматический транспорт канонических и вариантных гистонов в ответ на сигнал, полученный клеткой, является важным этапом в активации сборки хроматина и регуляции экспрессии генов (Park, Luger, 2006). Микроскопия флуоресцентно-меченого NAP1 показала, что в S-фазе клеточного цикла он находится в ядре, а во время фазы G2 он присутствует и в цитоплазме. Локализация NAP1 в цитоплазме у различных видов организмов предполагает его вовлеченность в механизм миграции гистонов между цитоплазмой и ядром (Marheineke, Krude, 1998). Это предположение подтверждается тем, что NAP1 взаимодействует с Kap114p — членом семейства белков кариофериннов (импортинов), ответственных за транспорт в

ядро гистонов H2A и H2B (Miyaji-Yamaguchi et al., 2003).

Представляет интерес вовлеченность NAP1 в эпигенетические процессы, связанные с модификацией гистонов. Исследования, проведенные на *D. melanogaster*, показали, что NAP1 участвует в регуляции транскрипции целевых генов сигнального *Notch*-пути, обеспечивая: 1) связывание белкового комплекса RLAF с комплексом Su(H)/H, 2) эффективное деметилирование гистона H3K4 гистоновой деметилазой LID, 3) эффективное деацетилирование H3 гистоновой деацетилазой RPD3, осуществляя таким образом контроль плотности нуклеосом в репрессированных локусах — целевых генах сигнального *Notch*-пути. Участие шаперона NAP1 в деметилировании и деацетилировании гистона H3 является примером эпигенетической регуляции генов, контролирующих развитие, через активность гистон-модифицирующих ферментов (Moshkin et al., 2009, 2013).

Также NAP1 вовлечен в процессы клеточной пролиферации (Kellogg et al., 1995), рекомбинации ДНК (Gao et al., 2012; Machida et al., 2014; Zhou et al., 2016), расхождении хромосом в митозе (Higgins, Herbert, 2013; Tachiwana et al., 2013; Shintomi et al., 2015) и репарации ДНК (Lankenau et al., 2003; Liu et al., 2009; Moshkin et al., 2013). Кроме того, гомологи NAP1 играют важную роль в развитии различных организмов. Например, в развитии листа и корневых волосков у *Arabidopsis* (Galichet, Gruissem, 2006; Zhu et al., 2017; Barna et al., 2018), а также в процессе формирования эпителия в эмбриогенезе у *C. elegans* (Patel et al., 2008), в сперматогенезе, миогенезе и нейрональном развитии у *Drosophila* (Bogdan et al., 2004; Schröter et al., 2004; Kimura, 2013), в дифференцировке и функционировании нервной системы у мышей (Attia et al., 2007).

Подсемейство NAP1-подобных белков

Количество представителей подсемейства NAP1-подобных белков (NAP1-like proteins), которые выявляют по гомологии их аминокислотных последовательностей с NAP1, постоянно растет. Функция многих из них до сих пор остается неизвестной. Есть доказательства того, что, по крайней мере, некоторые из них играют важную роль в регуляции пролиферации нейрональных клеток и формировании нервной системы (Okuwaki et al., 2010; Attia et al., 2013).

Подсемейство белков NAP1L включает: NAP1L1, NAP1L2, NAP1L3, NAP1L4, NAP1L5 и NAP1L6 (табл. 1) (Attia et al., 2013). Было обнаружено, что белковые последовательности самых древних членов семейства NAP1L1 и NAP1L4 идентичны на 64%. NAP1L1 и NAP1L4 экспрессируются повсеместно в тканях человека, тогда как NAP1L2,

Таблица 1. Представители семейства NAP1-подобных белков у человека

Название белка/альтернативное название	ID белка в базах данных	Известные функции	Ссылки на первое упоминание
Nucleosome assembly protein 1-like 1/NRP	NP_631946.1 P55209	Регулирует транспорт гистоновых димеров H2A-H2B и вариантного H2A (H2A.X, H2A.Z и макро-H2A1.2)-H2B и участвует в ассоциации этих гетеродимеров с ДНК, задействован в процессах разборки нуклеосом и замены гистонов	Simon et al., 1994
Nucleosome assembly protein 1-like 2/BPX	NP_068798.1 Q9ULW6	Контролирует экспрессию генов-мишеней, таких как регулятор клеточного цикла <i>Cdkn1c</i> , посредством воздействия на ацетилирование гистонов	Rougeulle, Avner, 1996
Nucleosome assembly protein 1-like 3/HB20	NP_004529.2 Q99457.2	Регулирует клеточный цикл, в частности арест в фазе G0 клеточного цикла	Watanabe et al., 1996
Nucleosome assembly protein 1-like 4/NAP2	NP_005960.1 Q9ULW6	Регулирует транспорт гистоновых димеров H2A-H2B и вариантного H2A (H2A.X, H2A.Z и макро-H2A1.2)-H2B и участвует в ассоциации этих гетеродимеров с ДНК, задействован в процессах разборки нуклеосом и замены гистонов	Prawitt et al., 1996 обнаружили ген и указали на гомологию с NAP Hu et al., 1996 – впервые упоминается как NAP2
Nucleosome assembly protein 1-like 5/DRLM	NP_715638.1 Q96NT1.1	Прекращение или экстремально низкая экспрессия вызывает онкогенез в тканях печени	Narada et al., 2002
Nucleosome assembly protein 1-like 6, pseudogene/NAP1L6	A6NFF2	Предположительно продукт псевдогена	Luo et al., 2009

NAP1L3 и NAP1L5 экспрессируются в мозге (Attia et al., 2013). Результаты недавних исследований показывают, что NAP1L1 и NAP1L4 играют основную роль в сборке и разборке базовых частиц нуклеосом, а также связываются с димерами H2A-H2B, регулируя тем самым механизм транскрипции (Okuwaki et al., 2010). Также они могут быть вовлечены в регуляцию судьбы клеток, контролируя экспрессию p53-зависимых генов, останавливающих клеточный цикл и активирующих апоптоз, посредством ацетилирования специфических сайтов p53 в ходе поддержания клеточного гомеостаза или в ответ на стресс (Tanaka et al., 2019).

У человека и мыши семейство NAP1-подобных белков состоит как минимум из пяти членов. Два из них (NAP1L1 и NAP1L4) были охарактеризованы как повсеместно экспрессирующиеся гистоновые шапероны, функции которых, за редким исключением, похожи (Simon et al., 1994; Rodriguez et al., 1997, 2000; Okuwaki et al., 2010). NAP1L1 человека (аналогично мышиному) играет ключевую роль в регуляции эмбрионального нейрогенеза, способствует пролиферации нейро-

нальных предшественников и ингибирует дифференцировку нейронов во время развития коры мозга (Qiao et al., 2018). Остальные три члена NAP1-подобных белков (NAP1L2, NAP1L3 и NAP1L5) являются нейрон-специфическими (Rougeulle, Avner, 1996; Watanabe et al., 1996; Shen et al., 2001; Smith et al., 2003). Биологическое значение нейрон-специфического белка NAP1L2 определили по дефектам нервной трубки, вызванной избыточной пролиферацией нейрональных стволовых клеток, и по снижению дифференцировки нейронов, возникающих во время эмбрионального развития у мышей-мутантов по гену *Nap1l2*. Другие члены подсемейства NAP1L также участвуют в раннем развитии нервной системы и важны для формирования мозга, поскольку демонстрируют различные специфичные для мозга паттерны экспрессии (Watanabe et al., 1996; Smith et al., 2003; Steer et al., 2003). Было показано, что NAP1L2 контролирует в нейрогенезе экспрессию регулятора клеточного цикла *Cdkn1c* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1c*), воздействуя на ацетилирование гистонов (Attia et al., 2007). Исследования в дрожжевой двугибридной системе, коиммунопреципи-

тация и компьютерный анализ структурных последовательностей всех пяти NAP1-подобных белков показали, что они способны напрямую взаимодействовать друг с другом через свои высококонсервативные α -спирали. Коэкспрессия всех NAP1-подобных белков в нейронах и влияние делеции *Nap1l2* на паттерны ядерно-цитоплазматического распределения белков NAP1L1 и NAP1L4 в клетке, позволяют предположить, что разнообразие взаимодействий между вышеупомянутыми белками необходимы для подготовки клеток к специфическим условиям нейрональной дифференцировки, таким как: межклеточное перераспределение определенных белков, модификация хроматина, регуляция транскрипции или рекрутирование на ДНК специфических факторов транскрипции (Attia et al., 2011).

NAP2 (NAP1L4)

При сравнении первичных последовательностей белков Nucleosome assembly protein-2 (NAP2 или NAP1L4) человека, мыши, дрожжей и дрозофилы было обнаружено несколько сходных областей. Участки, состоящие из кислых аминокислот, подобные тем, которые обнаруживаются в других белках NAP, могут облегчать контакт этих молекул с гистонами или другими основными белками (Stein et al., 1979; Jantzen et al., 1990; Sarkar et al., 2019). Кластеры отрицательно заряженных областей также обнаружены в гистон-связывающем белке N1 (histone-binding protein N1), нуклеоплазмине и негистоновом белке с высокой электрофоретической подвижностью (High-mobility-group protein-1) (Lapeyre et al., 1987; Schmidt-Zachmann et al., 1987; Wen et al., 1989). Делеционный анализ NAP1 дрожжей показал, что не все кислые домены необходимы для NAP-стимулированного переноса гистонов на ДНК (Fujii-Nakata et al., 1992). Спектр их функций в составе NAP значительно шире. В отличие от других белков NAP млекопитающих, которые имеют три кислых домена, NAP2 имеет только два таких домена. Как и NAP1, NAP2 переносит гистоны на "оголенную" (депротеинизированную) ДНК, хотя и с меньшей эффективностью. Делеция его С-концевого богатого кислыми аминокислотами региона останавливает перенос гистонов, что говорит о важности этого домена для активности NAP2.

Размер мРНК гена *Nap2* составляет 2.6–3.0 т.п.н. Она присутствует во всех проанализированных тканях человека, демонстрируя в три раза более высокий уровень в семенниках (Hu et al., 1996). Хотя позже было выяснено, что у свиньи NAP2 в наибольшей степени представлен в плаценте (Li et al., 2012).

Nap2 был впервые идентифицирован с помощью позиционного клонирования области 11p15.5, нару-

шение которой приводит к различным заболеваниям, включая опухоль Вильмса (Prawitt et al., 1996). Функциональный анализ рекомбинантного белка NAP2 человека показал, что он может взаимодействовать как с коровыми, так и с линкерными гистонами (Rodriguez et al., 1997). Последние исследования демонстрируют, что NAP2 регулирует пролиферацию клеток и апоптоз путем контроля экспрессии p53-зависимых генов (Tanaka et al., 2019).

Было показано, что NAP2 мигрирует между цитоплазмой и ядром. Его концентрация увеличивается при переходе клеток от пограничной фазы G0/G1 к фазе M (Rodriguez et al., 1997, 2000). В фазе G0/G1 он присутствует в цитоплазме, а затем начинает транслоцироваться в ядро, где и находится на протяжении всей S-фазы. Эти результаты аналогичны результатам, полученным для NAP1 дрозофилы (dNAP1). Отсюда сделали вывод, что белок присутствует в ядре во время S-фазы и является преимущественно цитоплазматическим во время фазы G2. Ито и соавторы (Ito et al., 1996) первыми предположили, что dNAP1 может функционировать в качестве шаперона для доставки гистонов из места их синтеза (цитоплазмы) в место использования (ядро), где они затем включаются в состав нуклеосом. NAP2 также способен связываться с коровыми и линкерными гистонами, транспортировать их, и его локализация зависит от фазы клеточного цикла, то есть этот шаперон функционирует аналогично dNAP1. Предполагаемый сигнал ядерной локализации высоко консервативен у NAP2, hNAP1L1 и mNAP1L1. Эта последовательность характерна ядерным белкам, но не было показано, что именно она определяет ядерную локализацию шаперона NAP2 (Dingwall, Laskey, 1991; Rodriguez et al., 1997).

Максимальная концентрация гистонов, связанных с NAP2, характерна для фазы G1/S, когда идет усиленный синтез гистонов для упаковки реплицированной ДНК (Rodriguez et al., 2000). Количество NAP2 в фазах G1/S и G2/M одинаково, но во время фазы митоза количество гистонов, связанных с NAP2, меньше, что свидетельствует о существовании NAP2, свободных от нехромосомной фракции гистонов, которые возможно участвуют в других процессах (Kellogg, Murray, 1995). Несколько работ решительно поддерживают идею фосфорилирования белка NAP2 во время его миграции из цитоплазмы в ядро. В этом отношении фосфорилирование может вызывать противоположные эффекты: либо это активация сигнала старта транспорта NAP2 в ядро (Jans, Hübner, 1996), либо маскировка сигнала ядерной локализации, которая предотвращает транспорт NAP2 в ядро (Jans, Hübner, 1996; Schwab, Dreyer, 1997). Кроме того, фосфорилирование NAP1 и NAP2 в экстрактах клеток HeLa устраняется гепарином, специфическим ингибитором протеиновой киназы СКII

(Casein Kinase 2), функция которой заключается в фосфорилировании различных субстратов. Добавление коровых гистонов *in vitro* может стимулировать фосфорилирование dNAP1 дрозофилы и NAP2 человека киназой СКII, в результате чего эти шапероны остаются в ядре и не выходят в цитоплазму. Наконец, в экспериментах *in vivo* было показано, что NAP2 является фосфопротеином (Rodriguez et al., 2000).

NAP2 образует комплекс как с коровыми, так и с линкерными гистонами на протяжении всего клеточного цикла. Связь с линкерным гистонем H1 белок NAP2 осуществляет эффективнее, нежели NAP1 (Rodriguez et al., 2000). Селективное связывание NAP1 с гистонами H2A/H2B (Ishimi et al., 1987), а NAP2 с гистонем H1 предполагает участие этих шаперонов в дополнительной стадии образования нуклеосом (этап IV) (рис. 3). Дальнейшие исследования на культурах клеток HeLa показали, что NAP2 является частью мультибелковых комплексов, которые, возможно, определяют специфичность связывания различных белков NAP с их гистоновым пулом (Rodriguez et al., 2004).

Позже Окуваки и соавторы (Okuwaki et al., 2010) обнаружили, что hNAP1L1 и NAP2 способны связываться с гистонами H2A-H2B и различными димерами вариантного H2A с H2B в клеточных экстрактах, где нет репликации ДНК. Этот факт позволил предположить, что оба hNAP1L играют решающую роль в независимой от репликации ДНК сборке хроматина (Okuwaki et al., 2010). В этой же работе было показано, что активность hNAP1L1 в плане разборки нуклеосом значительно выше, активности NAP2, что предполагает разные роли шаперонов hNAP1L1 и NAP2 в регуляции динамики гистонов. Было обнаружено, что N- и C-концевые области hNAP1L1 больше необходимы для эффективного вытеснения димеров H2A/H2B из базовой частицы нуклеосомы, чем для переноса гистонов на ДНК. Более того, области N- и C-концов NAP2 у химерных белков, полученных в результате совмещения их с последовательностью hNAP1L1, функционировали независимо друг от друга при вытеснении димеров H2A/H2B из базовой частицы нуклеосомы. Из этого следует, что для вытеснения гистонов необходимо совместное участие N- и C-концов обоих hNAP1L. Авторы сделали вывод, что N- и C-концевые области определяют специфичность hNAP1L к гистонам (Okuwaki et al., 2010).

Таким образом, шаперон NAP2 помимо участия в образовании нуклеосом играет важную роль в связывании с линкерным гистонем H1. Кроме того, NAP2 и hNAP1L1 связывают разные варианты гистоны H2A, образующие димеры с H2B, а особенности структуры этих белков, вероятно, определяют их специфическую роль в регуляции

динамики гистонов в ходе различных клеточных процессов.

CG5017 (HANABI, MILKAN, TNAP)

Изучение гена *CG5017* началось с получения мутации, которая вызывала усиление проявления аллеля *ss^a* гена *spineless* у *Drosophila melanogaster* (Kuzin et al., 1991). Мутация была получена путем мутагенеза после скрещивания мух линии *ss^{a40a}* с мухами дисгенной линии *w oc/FM4*. Индуцированный мутагенез вызвал инсерцию мобильного генетического *P*-элемента в регуляторную область гена *CG5017*. Полученная линия была обозначена *ss^{aSc}*. Мутантные особи линии *ss^{aSc}* отличались от мух исходной линии *ss^{a40a}* более выраженной трансформацией дистальных сегментов антенны в тарзус, слиянием тарсальных сегментов, уменьшением размера щетинок и увеличением количества зубцов полового гребешка (Sex comb – Sc) на передней ноге у самцов. Это была первая мутация гена *CG5017* с видимым фенотипическим проявлением, которое выражалась в усилении проявления мутации *ss^{a40a}* (Kuzin et al., 2010; Vorontsova et al., 2012).

Другими исследователями, в экспериментах по поиску мутаций, нарушающих память дрозофилы, были получены и две гипоморфные мутации гена *CG5017* (линии *milkah-1* и *milkah-2*). Оказалось, что они не приводят к морфологическим дефектам, но влияют на формирование долгосрочной памяти у дрозофил (Dubnau et al., 2003). Интересно, что эти две линии (и другие мутантные линии, полученные Дубнау и др.) были так названы в честь собак Павлова. Имена и фотографии 40 собак были обнаружены в 1992 году Тимом Талли (Tim Tally), одним из соавторов, во время его экскурсии по домашней резиденции Ивана Петровича Павлова в Санкт-Петербурге. Поиск генов, влияющих на долгосрочную и краткосрочную память дрозофилы, навело исследователя на мысль присвоить найденным мутантам имена подопытных собак Павлова.

Дубнау с соавторами продемонстрировал влияние гена *CG5017* на память и обучение у мух (Dubnau et al., 2003). Данные этих исследователей позднее были подтверждены в независимых экспериментах с использованием гипоморфного аллеля *CG5017 – ss^{aSc}* (Kuzin et al., 2014). У самцов дрозофил, несущих этот мутантный аллель, была нарушена долговременная память и обучение. Таким образом, было показано, что мутации гена *CG5017* влияют не только на морфогенез, но и на тонкие физиологические процессы формирования памяти.

Ген *CG5017* был картирован в районе 98В-5 хромосомы 3R. Последующие исследования показали, что открытая рамка считывания гена

CG5017 дрозофилы кодирует белок длиной 283 аминокислот, большая часть которого (аминокислоты с 46 по 252) представляет собой домен NAP. Выравнивание белковой последовательности *CG5017* и NAP1 выявило их сходство на 52%, в следствии чего, его отнесли к семейству NAP (Kuzin et al., 2010). На данный момент, ген имеет несколько названий: *CG5017*, *milkah* (Dubnau et al., 2003), *Hanabi* (Kimura, 2013) и *tNAP – testis-specific NAP* (Doyen et al., 2015).

Чтобы оценить физиологическую роль белка *CG5017*, была создана линия, несущая нулевую мутацию по этому гену (Kimura, 2013). Оказалось, что нуль-мутация *CG5017* нарушает процесс элонгации сперматид. Японский исследователь Кимура (Kimura, 2013) присвоил гену *CG5017* имя *Hanabi*, что в переводе значит “фейерверк”, поскольку фенотип сперматид в семеннике, в норме собранных в пачки на стадии их удлинения в ходе сперматогенеза, напоминал фейерверк из-за отсутствия их правильной кластеризации. Было показано, что мРНК *CG5017/Hanabi* присутствует в семенниках и теле самцов. Однако его мРНК не детектируется у дрозофил с удаленными семенниками, также *CG5017* не экспрессируется у самок (Kimura, 2013). Взрослые самцы, гомозиготные по нулевому аллелю *CG5017*, были полностью стерильны и не имели другого фенотипа; с другой стороны, самки были фертильны. Таким образом, было показано, что белок *CG5017* необходим для нормального протекания сперматогенеза у дрозофилы (Kimura, 2013) и является семенник-специфическим NAP (tNAP). Действительно, анализ данных, полученных методом RNA-seq, показал, что экспрессия *CG5017* крайне тканеспецифична в отличие от экспрессии NAP1, который широко экспрессируется во всех тканях на всех стадиях развития. мРНК гена *CG5017* в основном присутствует в семенниках и придаточных железах у самцов, однако она также детектируется в имагинальных дисках на третьей личиночной стадии и в жировом теле на стадии предкуколки (Brown et al., 2014). Кроме того, было показано, что *CG5017/tNAP* связывается с белком MST77F, который является обязательным компонентом хроматина сперматозоидов и необходим для мужской фертильности (Doyen et al., 2015).

К сожалению, белковый продукт гена *CG5017* пока остается практически не изученным. Однако можно предположить, что белок *CG5017* является важным эпигенетическим фактором, контролирующим работу гена *ss* во время развития (в делящихся клетках имагинальных дисков и в мозге), а также участвующим в организации цитоскелета сперматид в семенниках у *D. melanogaster*. Его гомология с NAP1 указывает на возможное участие в таких процессах, как сборка нуклеосом и регуляция генетической экспрессии через кон-

троль эффективности механизма ремоделирования хроматина. Эта гипотеза была проверена при помощи гуманизированных дрозофил, экспрессирующих ген Арил-гидрокарбонового рецептора (*AhR*) человека.

AhR является лиганд-активируемым транскрипционным фактором (Busbee et al., 2013; Larigot et al., 2018). При воздействии определенными веществами (ксенобиотиками) на клетку, AhR активирует экспрессию своих целевых генов. Для изучения последствий активации AhR ксенобиотиками *in vivo* была разработана оригинальная модельная система на основе трансформированных дрозофил, экспрессирующих *AhR* в клетках семенников, гомологичных клеткам Сертоли человека. Однако во время экспериментов экспрессия некоторых тестируемых целевых генов *AhR* не повышалась. Поскольку AhR является гомологом белка дрозофилы *Spineless*, который в свою очередь взаимодействует с *CG5017* (Kuzin et al., 1991), было выдвинуто предположение, что мутация гена *CG5017* может повлиять на транскрипционный статус целевых генов AhR при внесении ее в геном гуманизированных дрозофил. И действительно, активации AhR на фоне сниженной экспрессии *CG5017* привела к дерепрессии его генов-мишеней, участвующих в поддержании клеточного гомеостаза (*Cyp6g1*, *Mgat1*, *GstT4*, *Csas* и *Nans*) (Akishina et al., 2019).

Таким образом, независимые эксперименты Кимура (Kimura, 2013), Доен (Doyen et al., 2015) и Акишиной с соавторами (Akishina et al., 2019) показали участие нового белка семейства NAP – *CG5017/Hanabi/tNAP* – в сперматогенезе дрозофилы, где по данным Кимура (Kimura, 2013) *CG5017*, вероятно, взаимодействует со специфичным для семенников β -тубулином и актином, регулируя процессы полимеризации и деполимеризации белков цитоскелета, по данным Доен с соавторами (Doyen et al., 2015) формирует комплекс с семенник-специфическим белком MST77F и по данным Акишиной с соавторами (Akishina et al., 2019) может участвовать в эпигенетической репрессии ряда целевых генов AhR в клетках семенника, выполняющих трофическую функцию.

Известно, что другой член семейства *NAP* – *TSPY* является мультикопийным геном, продукт которого, также участвует в сперматогенезе у человека и крупного рогатого скота (Hamilton et al., 2012; Shen et al., 2013). В этом отношении белок дрозофилы *CG5017* может стать полезной моделью для понимания функции семенник-специфических белков семейства NAP, включая *TSPY*, в сперматогенезе человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия гистоны впечатляют своей уникальной и необычной биохимией. Знания, полученные в ходе изучения этих белков, в течение последнего десятилетия превратили их из статичных белков упаковки ДНК, в динамические модуляторы практически всех процессов, протекающих с участием ДНК. С гистонами тесно связана сеть гистоновых шаперонов. Благодаря своему структурному и функциональному разнообразию, гистоновые шапероны облегчают сборку нуклеосом. Они участвуют во всех аспектах биологии гистонов, от фолдинга в цитоплазме до импорта в ядро и формирования нуклеосом.

Подводя итоги, необходимо сказать, что почти все рассмотренные нами белки-шапероны (NAP1, NAP1L1, NAP1L2, NAP1L3, NAP1L4/NAP2, NAP1L5 и CG5017/Hanabi), взаимодействуя с гистонами, участвуют в регуляции клеточного цикла и ремоделировании хроматина. Идентификация семейства родственных гистон-связывающих белков-шаперонов с одинаковыми аминокислотными последовательностями в ряду от дрожжей до человека, говорит о том, что сборка хроматина является эволюционно консервативным процессом. Будучи каноническими переносчиками гистонов, и обеспечивая эффективный ремоделинг хроматина, белки семейства NAP участвуют в нейрональной дифференцировке, трофических процессах в сперматогенезе и формировании долговременной памяти, что указывает на важность этого семейства на онтогенезе.

Снижение нормальной экспрессии шаперонов семейства NAP или потеря их функциональности делает организм уязвимым к условиям внешней среды, нарушает фертильность, процесс запоминания и может стать причиной летального исхода. Таким образом, трудно переоценить важность гистоновых шаперонов для развития и нормальной жизнедеятельности организма, поэтому поиск и характеристика подобных белков важны не только для фундаментальной науки, но также будут иметь прикладное значение.

Однако ряд вопросов, касающихся механизма действия гистоновых шаперонов, остается пока без ответа. Является ли предложенная модель последовательной сборки нуклеосом реальной в условиях *in vivo*? Какие структурные особенности характерны для еще неописанных гистоновых шаперонов? Что способствует образованию отдельных специфических комплексов шаперонов с гистонами? Каково назначение регионов, богатых кислотными аминокислотами, присутствующих в последовательности большинства гистоновых шаперонов? Является ли функция шаперонов простой защитой гистонов от их неспецифических взаимодействий *in vivo*? Как регулируется активность гистоновых шаперонов? Одинаков ли механизм их

взаимодействия с коровыми и линкерными гистонами?

Отсутствие полного списка комплексов, которые могут формировать разные шапероны с разными гистонами, трудности интерпретации результатов, полученных *in vitro*, к ситуации *in vivo* затрудняют понимание механизма функционирования гистоновых шаперонов. Несмотря на это, в процессе изучения термодинамики сборки и разборки нуклеосом предлагаются гипотетические модели действия гистоновых шаперонов. Эти модели объясняют, как они связываются с гистонами, обеспечивая их специфическое взаимодействие и как сохраняют баланс процессов сборки и разборки нуклеосом. Доказательство этих гипотетических моделей должно стать ключевым в будущих исследованиях механизма действия гистоновых шаперонов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00272а) и в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0001 “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

Авторы А.А. Акишина и Е.Е. Куваева внесли одинаковый вклад: проводили 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

- Aguilar-Gurrieri C., Larabi A., Vinayachandran V. et al. Structural evidence for Nap1-dependent H2A-H2B deposition and nucleosome assembly // *EMBO J.* 2016. V. 2035. № 13. P. 1465–1482.
- Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O. et al. NAP family CG5017 chaperone pleiotropically regulates human AHR target genes expression in *Drosophila* testis // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 1. P. 118.

- Altman R., Kellogg D. Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase // *J. Cell Biol.* 1997. V. 138. № 1. P. 119–130.
- Attia M., Förster A., Rachez C. et al. Interaction between nucleosome assembly protein 1-like family members // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 407. № 5. P. 647–660.
- Attia M., Rachez C., Avner P. et al. Nucleosome assembly proteins and their interacting proteins in neuronal differentiation // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 534. № 1. P. 20–26.
- Attia M., Rachez C., De Pauw A. et al. Nap112 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 17. P. 6093–6102.
- Barna B., Gemes K., Domoki M. et al. *Arabidopsis* NAP-related proteins (NRPs) contribute to the coordination of plant growth, developmental rate, and age-related pathogen resistance under short days // *Plant Sci.* 2018. V. 267. P. 124–134.
- Bogdan S., Grewe O., Strunk M. et al. Sra-1 interacts with Kette and Wasp and is required for neuronal and bristle development in *Drosophila* // *Development.* 2004. V. 131. № 16. P. 3981–3989.
- Brennan C.M., Steitz J.A. HuR and mRNA stability // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. № 2. P. 266–277.
- Brown J.B., Boley N., Eisman R. et al. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome // *Nature.* 2014. V. 512. № 7515. P. 393–399.
- Busbee P.B., Rouse M., Nagarkatti M. et al. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders // *Nutr. Rev.* 2013. V. 71. № 6. P. 353–369.
- Canela N., Rodriguez-Vilarrupla A., Estanyol J.M. et al. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 2. P. 1158–1164.
- Chai Z., Sarcevic B., Mawson A. et al. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 36. P. 33665–33674.
- Chang L., Loranger, S.S., Mizzen C. et al. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 3. P. 469–480.
- Chen X., D'Arcy S., Radebaugh C.A. et al. Histone chaperone Nap1 is a major regulator of histone H2A-H2B dynamics at the inducible GAL locus // *Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 36. № 8. P. 1287–1296.
- Compagnone N.A., Zhang P., Vigne J.L. et al. Novel role for the nuclear phosphoprotein set in transcriptional activation of p450c17 and initiation of neurosteroidogenesis // *Mol. Endocrinol.* 2000. V. 14. № 6. P. 875–888.
- Das C., Tyler J.K., Churchill M.E. The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance // *Trends Biochem. Sci.* 2010. V. 35. № 9. P. 476–489.
- Dingwall C., Laskey R.A. Nuclear targeting sequences – a consensus? // *Trends Biochem. Sci.* 1991. V. 16. № 12. P. 478–481.
- Doyen C.M., Chalkley G.E., Voets O. et al. A testis-specific chaperone and the chromatin remodeler ISWI mediate repackaging of the paternal genome // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 7. P. 1310–1318.
- Dubnau J., Chiang A.S., Grady L. et al. The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. № 4. P. 286–296.
- Eitoku M., Sato L., Senda T. et al. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 3. P. 414–444.
- Elsässer S.J., D'Arcy S. Towards a mechanism for histone chaperones // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1819. № 3–4. P. 211–221.
- Fan Z., Beresford P.J., Oh D.Y. et al. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor // *Cell.* 2003. V. 112. № 5. P. 659–672.
- Fujii-Nakata T., Ishimi Y., Okuda A. et al. Functional analysis of nucleosome assembly protein, NAP-1. The negatively charged COOH-terminal region is not necessary for the intrinsic assembly activity // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 29. P. 20980–20986.
- Galichet A., Grissem W. Developmentally controlled farnesylation modulates AtNAP1;1 function in cell proliferation and cell expansion during *Arabidopsis* leaf development // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. № 4. P. 1412–1426.
- Gamble M.J., Erdjument-Bromage H., Tempst P. et al. The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 2. P. 797–807.
- Gao J., Zhu Y., Zhou W. et al. NAP1 family histone chaperones are required for somatic homologous recombination in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* 2012. V. 24. № 4. P. 1437–1447.
- Hamilton C.K., Verduzco-Gómez A.R., Favetta L.A. et al. Testis-specific protein Y-encoded copy number is correlated to its expression and the field fertility of Canadian Holstein bulls // *Sex. Dev.* 2012. V. 6. № 5. P. 231–239.
- Hammond C.M., Strømme C.B., Huang H. et al. Histone chaperone networks shaping chromatin function // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. № 3. P. 141–158.
- Harada H., Nagai H., Ezura Y. et al. Down-regulation of a novel gene, *DRLM*, in human liver malignancy from 4q22 that encodes a NAP-like protein // *Gene.* 2002. V. 296. № 1–2. P. 171–177.
- Haruki H., Okuwaki M., Miyagishi M. et al. Involvement of template-activating factor I/SET in transcription of adenovirus early genes as a positive-acting factor // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 2. P. 794–801.
- Heshmati Y., Kharazi S., Türköz G. et al. The histone chaperone NAP1L3 is required for haematopoietic stem cell maintenance and differentiation // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 11202.
- Higgins J.M.G., Herbert M. Nucleosome assembly proteins get SET to defeat the guardian of chromosome cohesion // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 9. P. e1003829.
- Hu R.J., Lee M.P., Johnson L.A. et al. A novel human homologue of yeast nucleosome assembly protein, 65 kb centromeric to the *p57KIP2* gene, is biallelically expressed in fetal and adult tissues // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. № 11. P. 1743–1748.

- Ishimi Y., Kikuchi A. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly *in vitro* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 11. P. 7025–7029.
- Ishimi Y., Kojima M., Yamada M. et al. Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones // Eur. J. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 19–24.
- Ishimi Y., Yasuda H., Hirosumi J. et al. A protein which facilitates assembly of nucleosome-like structures in vitro in mammalian cells // J. Biochem. 1983. V. 94. № 3. P. 735–744.
- Ito T., Bulger M., Kobayashi R. et al. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays // Mol. Cell. Biol. 1996. V. 16. № 6. P. 3112–3124.
- Ito T., Ikehara T., Nakagawa T. et al. p300-Mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A–H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone // Genes Dev. 2000. V. 14. № 15. P. 1899–1907.
- Jans D.A., Hübner S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation // Physiol. Rev. 1996. V. 76. № 3. P. 651–685.
- Jantzen H.M., Admon A., Bell S.P. et al. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins // Nature. 1990. V. 344. № 6269. P. 830–836.
- Kawase H., Okuwaki M., Miyaji M. et al. NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure // Genes Cells. 1996. V. 1. № 12. P. 1045–1056.
- Kellogg D.R., Kikuchi A., Fujii-Nakata T. et al. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins // J. Cell Biol. 1995. V. 130. № 3. P. 661–673.
- Kellogg D.R., Murray A.W. NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast // J. Cell Biol. 1995. V. 130. № 3. P. 675–685.
- Kepert J.F., Mazurkiewicz J., Heuvelman G.L. et al. NAP1 modulates binding of linker histone H1 to chromatin and induces an extended chromatin fiber conformation // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 40. P. 34063–34072.
- Kido T., Lau Y.C. The Y-linked proto-oncogene *TSPY* contributes to poor prognosis of the male hepatocellular carcinoma patients by promoting the pro-oncogenic and suppressing the anti-oncogenic gene expression // Cell Biosci. 2019. V. 9. P. 22.
- Kimura S. The Nap family proteins, CG5017/Hanabi and Nap1, are essential for Drosophila spermiogenesis // FEBS Lett. 2013. V. 587. № 7. P. 922–929.
- Krajewski W.A. The intrinsic stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes and their in vitro assembly/disassembly by histone chaperone NAP1 // Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj. 2020. V. 1864. № 3. P. 129497.
- Krick R., Jakubiczka S., Arnemann J. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (*TSPY*) genes // Gene. 2003. V. 302. № 1–2. P. 11–19.
- Kuzin B.A., Doszhanov K.T., Simonova O.B. et al. A new allele variant of *ss^a* and its participation in regulating the proliferation of the stem elements of the leg and antenna imaginal disks in *Drosophila melanogaster* // Ontogenez. 1991. V. 22. № 2. P. 212–216.
- Kuzin B.A., Modestova E.A., Vorontsova Y.E. et al. Interaction of the *ss* and *CG5017* genes in the regulation of morphogenesis of limbs in *Drosophila melanogaster* // Russ. J. Dev. Biol. 2010. V. 41. № 5. P. 312–317.
- Kuzin B.A., Nikitina E.A., Cherezov R.O. et al. Combination of hypomorphic mutations of the *Drosophila* homologues of aryl hydrocarbon receptor and nucleosome assembly protein family genes disrupts morphogenesis, memory and detoxification // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. e94975.
- Lankenau S., Barnickel T., Marhold J. et al. Knockout targeting of the *Drosophila nap1* gene and examination of DNA repair tracts in the recombination products // Genetics. 2003. V. 163. № 2. P. 611–623.
- Lapeyre B., Bourbon H., Amalric F. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 6. P. 1472–1476.
- Larigot L., Juricek L., Dairou J. et al. AhR signaling pathways and regulatory functions // Biochim. Open. 2018. V. 7. P. 1–9.
- Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D. et al. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // Nature. 1978. V. 275. № 5679. P. 416–420.
- Li S., Li J., Tian J. et al. Characterization, tissue expression, and imprinting analysis of the porcine *CDKN1C* and *NAP1L4* genes // J. Biomed. Biotechnol. 2012. V. 2012. P. 946527.
- von Lindern M., van Baal S., Wiegant J. et al. *Can*, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the *set* gene // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. № 8. P. 3346–3355.
- Liu Y., Xu L., Xie C. et al. Structural insights into ceNAP1 chaperoning activity toward ceH2A–H2B // Structure. 2019. V. 27. № 12. P. 1798–1810. e3.
- Liu Z., Zhu Y., Gao J. et al. Molecular and reverse genetic characterization of NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1 (NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2009. V. 59. № 1. P. 27–38.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // Nature. 1997. V. 389. № 6648. P. 251–260.
- Luo J., Emanuele M.J., Li D. et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the *Ras* oncogene // Cell. 2009. V. 137. № 5. P. 835–848.
- Machida S., Takaku M., Ikura M. et al. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1 // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 4863.
- Marheineke K., Krude T. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 24. P. 15279–15286.

- Mattiroli F., D'Arcy S., Luger K.* The right place at the right time: chaperoning core histone variants // *EMBO Rep.* 2015. V. 16. № 11. P. 1454–1466.
- Mazurkiewicz J., Kepert J.F., Rippe K.* On the mechanism of nucleosome assembly by histone chaperone NAP1 // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 24. P. 16462–16472.
- McBryant S.J., Park Y.J., Abernathy S.M. et al.* Preferential binding of the histone (H3-H4)₂ tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44574–44583.
- Miyaji-Yamaguchi M., Kato K., Nakano R. et al.* Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 18. P. 6672–6684.
- Mortensen E.M., McDonald H., Yates J. 3rd et al.* Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. № 6. P. 2091–2105.
- Mosammaparast N., Ewart C.S., Pemberton L.F.* A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 23. P. 6527–6538.
- Moshkin Y.M., Doyen C.M., Kan T.W. et al.* Histone chaperone NAP1 mediates sister chromatid resolution by counteracting protein phosphatase 2A // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 9. P. e1003719.
- Moshkin Y.M., Kan T.W., Goodfellow H. et al.* Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing // *Mol. Cell.* 2009. V. 35. № 6. P. 782–793.
- Ohkuni K., Shirahige K., Kikuchi A.* Genome-wide expression analysis of NAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 306. № 1. P. 5–9.
- Okuwaki M., Kato K., Nagata K.* Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones // *Genes Cells.* 2010. V. 15. № 1. P. 13–27.
- Oram S.W., Liu X.X., Lee T.L. et al.* TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells // *BMC Cancer.* 2006. V. 6. P. 154.
- Ozgun L.L., You L., Kiang S. et al.* Identification of differentially expressed nucleolar TGF- β 1 target (DENTT) in human lung cancer cells that is a new member of the TSPY/SET/NAP-1 superfamily // *Genomics.* 2001. V. 73. № 2. P. 179–193.
- Park Y.J., Chodaparambil J.V., Bao Y. et al.* Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 3. P. 1817–1825.
- Park Y.J., Luger K.* The structure of nucleosome assembly protein 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. № 5. P. 1248–1253.
- Patel F.B., Bernadskaya Y.Y., Chen E. et al.* The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis // *Dev. Biol.* 2008. V. 324. № 2. P. 297–309.
- Prawitt D., Munroe D.J., Pelletier J. et al.* Loss of heterozygosity at Identification of a NAP related gene in the Wilms' tumor candidate *11p15* in malignant glioma // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. A79.
- Puffenberger E.G., Hu-Lince D., Parod J.M. et al.* Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of TSPYL loss of function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. № 32. P. 11689–11694.
- Qiao H., Li Y., Feng C. et al.* Nap111 controls embryonic neural progenitor cell proliferation and differentiation in the developing brain // *Cell Rep.* 2018. V. 22. № 9. P. 2279–2293.
- Rodriguez P., Munroe D., Prawitt D. et al.* Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone // *Genomics.* 1997. V. 44. № 3. P. 253–265.
- Rodriguez P., Pelletier J., Price G.B. et al.* NAP-2: histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 298. № 2. P. 225–238.
- Rodriguez P., Ruiz M.T., Price G.B. et al.* NAP-2 is part of multi-protein complexes in HeLa cells // *J. Cell. Biochem.* 2004. V. 93. № 2. P. 398–408.
- Rougeulle C., Avner P.* Cloning and characterization of a murine brain specific gene *Bpx* and its human homologue lying within the *Xic* candidate region // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. № 1. P. 41–49.
- Sarkar P., Zhang N., Bhattacharyya S. et al.* Characterization of *Caenorhabditis elegans* nucleosome assembly protein 1 uncovers the role of acidic tails in histone binding // *Biochemistry.* 2019. V. 58. № 2. P. 108–113.
- Schmidt-Zachmann M.S., Hügle-Dörr B., Franke W.W.* A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 7. P. 1881–1890.
- Schnieders F., Dörk T., Arnemann J. et al.* Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. № 11. P. 1801–1807.
- Schröter R.H., Lier S., Holz A. et al.* Kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila* // *Development.* 2004. V. 131. № 18. P. 4501–4509.
- Schwab M.S., Dreyer C.* Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin // *Eur. J. Cell. Biol.* 1997. V. 73. № 4. P. 287–297.
- Shen H.H., Huang A.M., Hoheisel J. et al.* Identification and characterization of a SET/NAP protein encoded by a brain-specific gene, *MB20* // *Genomics.* 2001. V. 71. № 1. P. 21–33.
- Shen Y., Yan Y., Liu Y. et al.* A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the *gr/gr* deletion // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22. № 8. P. 1679–1695.
- Shikama N., Chan H.M., Krstic-Demonacos M. et al.* Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 23. P. 8933–8943.
- Shimizu Y., Akashi T., Okuda A. et al.* NBP1 (Nap1 binding protein 1), an essential gene for G2/M transition of *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a protein of distinct subnuclear localization // *Gene.* 2000. V. 246. № 1–2. P. 395–404.

- Shintomi K., Takahashi T.S., Hirano T.* Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 8. P. 1014–1023.
- Simon H.U., Mills G.B., Kozlowski M. et al.* Molecular characterization of hNRP, a cDNA encoding a human nucleosome-assembly-protein-I-related gene product involved in the induction of cell proliferation // *Biochem. J.* 1994. V. 297. P. 389–397.
- Smith R.J., Dean W., Konfortova G. et al.* Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation // *Genome Res.* 2003. V. 13. № 4. P. 558–569.
- Steer W.M., Abu-Daya A., Brickwood S.J. et al.* Xenopus nucleosome assembly protein becomes tissue-restricted during development and can alter the expression of specific genes // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. № 9. P. 1045–1057.
- Stein A., Whitlock J.P., Bina M.* Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin *in vitro* at physiological ionic strength // *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. V. 76. № 10. P. 5000–5004.
- Tachiwana H., Miya Y., Shono N. et al.* Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 5. P. 2869–2880.
- Tanaka T., Hozumi Y., Martelli A.M. et al.* Nucleosome assembly proteins NAP1L1 and NAP1L4 modulate p53 acetylation to regulate cell fate // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2019. V. 1866. № 5. P. 118560.
- Valieva M.E., Feofanov A.V., Studitsky V.M.* Histone chaperones: Variety and functions // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. V. 71. P. 165–169.
- Vogel T., Dittrich O., Mehraein Y. et al.* Murine and human TSPYL genes: novel members of the TSPY-SET-NAP1L1 family // *Cytogenet. Cell Genet.* 1998. V. 81. № 3–4. P. 265–270.
- Vorontsova Y.E., Cherezov R.O., Zatssepina O.G. et al.* Gene expression modulation is an evolutionary resource of adaptive alterations in the morphogenesis of insect limbs // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2012. V. 39. P. 186–193.
- Watanabe T.K., Fujiwara T., Nakamura Y. et al.* Cloning, expression pattern and mapping to Xq of NAP1L3, a gene encoding a peptide homologous to human and yeast nucleosome assembly proteins // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. V. 74. № 4. P. 281–285.
- Wen L., Huang J.K., Johnson B.H. et al.* A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1 // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. № 3. P. 1197–1214.
- Zhang Q., Giebler H.A., Isaacson M.K. et al.* Eviction of linker histone H1 by NAP-family histone chaperones enhances activated transcription // *Epigenetics Chromatin.* 2015. V. 8. P. 30.
- Zhou W., Gao J., Ma J. et al.* Distinct roles of the histone chaperones NAP1 and NRP and the chromatin-remodeling factor INO80 in somatic homologous recombination in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2016. V. 88. № 3. P. 397–410.
- Zhou W., Zhu Y., Dong A. et al.* Histone H2A/H2B chaperones: from molecules to chromatin-based functions in plant growth and development // *Plant J.* 2015. V. 83. № 1. P. 78–95.
- Zhu Y., Rong L., Luo Q. et al.* The histone chaperone NRP1 interacts with WEREWOLF to activate GLABRA2 in *Arabidopsis* root hair development // *Plant Cell.* 2017. V. 29. № 2. P. 260–276.

NAP Family Histone Chaperones: Characterization and Role in Ontogenesis

A. A. Akishina¹, E. E. Kuvaeva¹, Y. E. Vorontsova¹, and O. B. Simonova^{1, *}

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

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Histone chaperones are a class of proteins that bind and transport histones, preventing them from chaotic aggregation during nucleosome formation. NAP (Nucleosome Assembly Protein) family histone chaperones contain the highly conserved central NAP domain required for histone binding and nucleosome assembly. They are an integral component in the creation and maintenance of eukaryotic chromatin dynamics, which determines the transcription of many genes. Here, we review the NAP protein family and its specific members: NAP1, NAP2 and CG5017/Hanabi. NAP family proteins are canonical histone transporters and make effective chromatin remodeling. They are involved in neuronal differentiation, spermatogenesis and the formation of long-term memory, indicating the importance of this family in ontogenesis.

Keywords: histone chaperone, nucleosome, chromatin, ontogenesis

УДК 612.67;591.3;611.81;592/599

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ НА ОНТОГЕНЕЗ ПОТОМСТВА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2020 г. С. В. Раннева^{a, b}, Е. Ю. Брусенцев^a, Т. Н. Игонина^a, Д. С. Рагаева^a, И. Н. Рожкова^a,
Н. И. Ершов^a, А. Л. Левинсон^c, С. Я. Амстиславский^{a, b, *}

^aФГБНУ “ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН”, пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

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

^cНовосибирский центр репродуктивной медицины, ул. Героев Революции, 3, Новосибирск, 630037 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.02.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

Представлен обзор данных, касающихся влияния вспомогательных репродуктивных технологий, главным образом культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов, на пре- и постнатальное развитие млекопитающих. Рассмотрены особенности воздействия питательных сред на развитие зародыша и на формирующийся плод. Особое внимание уделено отдаленным эффектам у потомков, рожденных после применения этих процедур.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, культивирование *in vitro*, преимплантационный эмбрион, плод, онтогенез, эпигенетика, отдаленные эффекты

DOI: 10.31857/S0475145020060075

ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) применяют в медицине для преодоления бесплодия уже более 40 лет (Stephoe, Edwards, 1978; Berntsen et al., 2019). Согласно международному глоссарию, под термином “ВРТ” подразумеваются любые манипуляции *in vitro* с ооцитами, сперматозоидами или эмбрионами человека с целью репродукции, в том числе культивирование эмбрионов *in vitro* (Zegers-Hochschild et al., 2017). Фундаментальные процессы эпигенетического репрограммирования генома, которые происходят на стадии созревания гамет и раннего эмбрионального развития млекопитающих, совпадают по времени с некоторыми этапами ВРТ, в частности, с культивированием эмбрионов в искусственных средах (Reik et al., 2001). Между тем, питательные среды, в которых развиваются *in vitro* эмбрионы млекопитающих, отличаются по качественному и количественному составу от внутриутробной среды яйцеводов и матки, в которых происходит раннее пренатальное развитие *in vivo* (Summers, Biggers, 2003; Aguilar, Reyley, 2005). Кроме того, эмбрионы при культивировании *in vitro* испытывают недостаток в сигнальных молекулах (гормоны, цитокины, факторы роста) со стороны репродуктивного тракта (Makieva et al., 2018). Это может быть устранено добавлением соответствующих компо-

нентов в культуральную среду, в том числе жидкой среды яйцевода и матки, а также со-культивированием эмбрионов с аутологичными клетками эндометрия (Canovas et al., 2017; Le Saint et al., 2019). Тем не менее, в ходе культивирования эмбрионы подвергаются действию различных факторов: флуктуации рН, высокой концентрации кислорода, изменению осмоляльности и других (Sunde, 2019). Эти факторы могут приводить к нарушениям естественных процессов репрограммирования, а именно отсутствию деметилирования, либо, напротив, aberrантному метилированию локусов, которые в норме не являются метилированными, и фенотипическим отклонениям, в частности, возрастанию риска заболеваний, связанных с нарушением геномного импринтинга у потомков (Mani et al., 2020).

В настоящее время накапливаются данные о здоровье детей, рожденных после применения ВРТ (Berntsen et al., 2019; Ramos-Ibeas et al., 2019; Sunde, 2019). Дети, зачатые с использованием ВРТ, чаще рождаются преждевременно, также у них чаще наблюдается сниженная масса тела при рождении (Hayashi et al., 2012). Однако на текущий момент нет однозначного ответа на вопрос, является ли это эффектом от применения ВРТ или следствием бесплодия и возраста родителей (Hayashi et al 2012; Sunkara et al., 2019). Поэтому

изучение влияния культивирования *in vitro* и других этапов ВРТ на онтогенез и фенотипические характеристики потомства в постнатальный период является крайне актуальным. Первая глава нашего обзора посвящена историческим аспектам разработки сред для культивирования эмбрионов человека и животных, а также современному состоянию данной проблемы. В следующих главах мы акцентировали внимание на влиянии некоторых этапов ВРТ, связанных с экстракорпоральным оплодотворением (ЭКО) и культивированием эмбрионов *in vitro*, на пре- и постнатальное развитие организма млекопитающих. Рассмотрение более сложных протоколов, включающих в себя криоконсервацию гамет и эмбрионов, а также преимплантационную генетическую диагностику, выходит за рамки данного обзора.

ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Жидкая среда яйцеводов и матки млекопитающих обеспечивает необходимые условия для ооцитов, движения сперматозоидов, оплодотворения и раннего развития эмбрионов (Aguilar, Reyley, 2005; Aviles et al., 2010). Естественная питательная среда половых путей самки содержит множество различных соединений, которые поступают туда через кровь, либо синтезируются эпителиальными клетками репродуктивного тракта (Leese, 1988). Важными компонентами среды яйцеводов и матки являются ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , энергетические субстраты (лактат, пируват, глюкоза), разнообразные аминокислоты, протеины, простагландины, стероидные гормоны и ростовые факторы, такие как инсулиноподобный фактор роста первого типа – IGF-1, эпидермальный фактор роста – EGF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор – GM-CSF (Aguilar, Reyley, 2005). Список эмбриотропных факторов, секретируемых эпителиальными клетками репродуктивного тракта, до сих пор точно не определен и с каждым годом растет (Aviles et al., 2010). Для обеспечения развития преимплантационных эмбрионов *in vitro* важно использовать растворы с правильно подобранными компонентами в оптимальных концентрациях, а также наиболее приемлемый газовый состав атмосферы, в которой осуществляется данный процесс.

*Разработка питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих*

При создании питательных сред исследователи используют два основных подхода: “back-to-nature”, когда компоненты и их концентрации стараются сделать максимально приближенными по составу к таковым репродуктивных путей

и “let embryo choose”, когда их состав подбирают эмпирическим путем (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014). В настоящее время наиболее популярными средами для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов лабораторных животных являются: KSOM, KSOMaa, HECM, mR1ECM, G1/2, SOF, CZB (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Finger et al., 2015; Belli et al., 2019). Состав этих питательных сред представлен в табл. 1. Питательные среды, которые были весьма популярны при культивировании эмбрионов лабораторных животных ранее, в частности, среда M16, разработанная в 1971 г., представляют, в наше время, скорее исторический интерес (Summers, Biggers, 2003) и в таблицу не включены. Некоторые из культуральных сред, представленных в табл. 1, состоят из минимального числа необходимых веществ, подобранных по принципу “let embryo choose”, как, например, среда KSOM (K^+ simplex optimized medium), которая содержит 11 ингредиентов (при добавлении сывороточного альбумина – 12). Несмотря на небольшое число компонентов, данная среда является сбалансированной по их концентрациям и оптимально подходит для развития ранних зародышей мышей (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014). Однако для других видов млекопитающих используют, зачастую, более богатые компонентами варианты этой среды, в частности, KSOMaa, в которой 32 компонента, благодаря добавлению аминокислот (Biggers et al., 2000; Summers, 2014; Belli et al., 2019).

В среды для культивирования эмбрионов некоторых животных добавляют 5–15% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или других млекопитающих (Han, Niwa, 2003; Amstislavsky et al., 2018). Также для оптимизации среды иногда добавляют репродуктивные жидкости (фолликулярную, яйцевода или матки). Так, например, в эксперименте по культивированию ранних зародышей свиней добавление этих компонентов не только улучшает качество развивающихся бластоцист, но и корректирует эпигенетические изменения, вызванные применением ВРТ (Canovas et al., 2017). Другим подходом для оптимизации питательной среды является добавление в нее осмолитов, таких как сывороточный альбумин (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Brusentsev et al., 2018) или его синтетические аналоги, в частности, поливиниловый спирт – ПВС (Cozzi et al., 2010; Брусенцев и др., 2014). В качестве ресурса для пластического обмена используют свободные аминокислоты (Cozzi et al., 2010).

Преодоление двухклеточного блока развития преимплантационных эмбрионов грызунов

Проблемой культивирования со стадии зиготы ранних зародышей грызунов (мышей, хомячков,

Таблица 1. Состав некоторых синтетических питательных сред, наиболее часто используемых при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов лабораторных животных

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов мМ за исключением сноски)									
	KSOM ³	KSOM _{aa} ^{4,6}	KSOM _{gaa} ⁵	HECM ²	mR1ECM ⁷	G1.2/2.2 ⁴		SOF ¹	SOFAa ⁶	CZB ⁴
NaCl	95.0	95.0	95.0	98.0	110.0	90.1	90.1	107.7	107.7	81.3
KCl	2.5	2.5	2.5	3.2	3.2	5.5	5.5	7.2	7.2	4.7
CaCl ₂	1.7	1.7	1.7	2.0	2.0	1.8	1.8	1.7	1.2	1.7
MgCl ₂	—	—	—	0.5	0.5	—	—	0.5	0.5	—
MgSO ₄	0.2	0.2	0.2	—	—	1.0	1.0	—	—	1.2
NaHCO ₃	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.1	25.1	25.0
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4	0.4	—	—	—	—	1.2	1.2	1.2
NaH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	0.3	0.3	—	—	—
Лактат натрия	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.5	5.9	3.3	3.3	31.3
Пируват натрия	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.3	0.1	0.3	0.4	0.3
Глюкоза	0.2	0.2	5.56	—	7.5	0.5	3.2	1.5	—	—
Глутамин	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.5	—	—	—	1.0
Таурин	—	—	—	7.0	—	—	—	—	—	—
ЭДТА	0.01	0.01	0.01	—	—	0.01	—	—	—	0.1
Инозитол	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—
Никотинамид	—	—	—	—	—	—	0.08	—	—	—
Пантотенат	—	—	—	—	—	—	0.004	—	—	—
Пиридоксин	—	—	—	—	—	—	0.005	—	—	—
Рибофлавин	—	—	—	—	—	—	0.0003	—	—	—
Тиамин	—	—	—	—	—	—	0.003	—	—	—
Фолиевая к-та	—	—	—	—	—	—	0.002	—	—	—
Холин хлорид	—	—	—	—	—	—	0.007	—	—	—
СА ^а	1.0*	3.0*	1.0*	—	4.0*	2.0*	2.0*	32*	8*	5.0*
ПВС ^б	—	—	—	1.0*	—	—	—	—	—	—
ЗАК ^в	—	1.0 [#]	1.0 [#]	2.0 [#]	2.0 [#]	2.0 [#]	2.0 [#]	—	2.0 [#]	—
НЗАК ^г	—	0.5 [#]	0.5 [#]	1.0 [#]	1.0 [#]	1.0 [#]	1.0 [#]	—	1.0 [#]	—

^а Сывороточный альбумин, ^б поливиниловый спирт, ^в заменимые аминокислоты, ^г незаменимые аминокислоты; * – мг/мл, # – % (v/v). ¹ Tervit et al., 1972; ² Schini, Bavister, 1988; ³ Lawitts, Biggers, 1993; ⁴ Gardner et al., 2004; ⁵ Biggers et al., 2005; ⁶ Sagirkaya et al., 2006; ⁷ Cozzi et al., 2010.

крыс) долгое время являлся двухклеточный блок развития (Schini, Bavister, 1988; Lawitts, Biggers, 1991; Miyoshi et al., 1994). Многочисленные попытки преодоления блока включали в себя модификацию состава сред путем изменения концентраций некоторых базовых компонентов: NaCl, KCl, NaHCO₃, KH₂PO₄, пирувата, глюкозы, а также добавлением дополнительных компонентов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и глутамин (Chatot et al., 1990). С использованием симплекс-метода, который позволил оптимизировать концентрации компонентов культуральной среды, Джоном Биггерсом и его коллегами была создана среда SOM – simplex optimized medium (Lawitts, Biggers, 1991; Summers, 2014).

Культивирование на данной среде позволило не только преодолеть двухклеточный блок развития эмбрионов мышей, но и получить высокий процент бластоцист (Lawitts, Biggers, 1991). Впоследствии среда SOM была модифицирована и получила название KSOM, то есть среда SOM, обогащенная калием (Lawitts, Biggers, 1993). Исследователи показали успешное развитие мышечных эмбрионов до стадии бластоцисты на модифицированной среде mKSOM, обогащенной глюкозой (Biggers, McGinnis, 2001). Также было установлено, что в случае с мышечными эмбрионами, наличие в среде KSOM фосфатов вызывает блок развития лишь у малой группы зигот, чувствительных к данному компоненту (Biggers, McGinnis, 2001).

Между тем, было показано негативное влияние наличия фосфатов в культуральной среде на развитие эмбрионов хомячков (Schini, Bavister, 1988) и крыс (Miyoshi et al., 1994). Для культивирования эмбрионов хомячков была создана среда hamster embryo culture medium (HECM), в которой отсутствуют фосфаты (табл. 1). До настоящего времени было создано десять модификаций этой среды (Seshagiri, Vani, 2019). На основе HECM была создана специализированная среда rat one-cell embryo culture medium (R1ECM), предназначенная для культивирования эмбрионов крыс (табл. 1). Эмбрионы некоторых линий крыс удавалось культивировать при помощи этой среды вполне успешно (Miyoshi et al., 1994; Брусенцев и др., 2015). Между тем, недавно была создана модификация среды KSOM, предназначенная для культивирования крысиных эмбрионов (KSOM-R), в составе которой были исключены все фосфаты и добавлены таурин, глицин, глутамат и аланин (Nakamura et al., 2016). Было показано, что в среде KSOM-R эмбрионы крыс развиваются быстрее, чем в mR1ECM (Men et al., 2020).

*Оптимальные среды для культивирования
преимплантационных эмбрионов разных
видов млекопитающих*

На сегодняшний день не существует универсальной питательной среды, на которой можно было бы культивировать *in vitro* преимплантационные эмбрионы всех видов млекопитающих. Тем не менее, большой прогресс достигнут в оптимизации культуральных сред в экспериментах, при культивировании эмбрионов лабораторных животных (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Summers, 2014). В настоящее время, успешно культивируют ранние зародыши таких млекопитающих как куньи (Amstislavsky et al., 2012), кошачьи (Herrick et al., 2007; Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018), псовые (Lindeberg et al., 1993; Luvoni et al., 2006), КРС (Sugimura et al., 2012) и многих других. При культивировании эмбрионов млекопитающих необходимо учитывать их видовую специфику (Amstislavsky et al., 2012), так как существенные отличия наблюдаются при развитии *in vitro* зародышей даже таких близкородственных видов грызунов, как мыши (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2015), крысы (Miyoshi et al., 1995; Han, Niwa, 2003; Брусенцев и др., 2015; Igonina et al., 2019) и хомячки (Schini, Bavister, 1988; Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015). При подборе концентраций компонентов питательных сред, в частности, пирувата также учитывают видовую специфику. Примером служат эмбрионы свиней, богатые липидными гранулами, потребности которых отличаются от эмбрионов мышей с низким содержанием внутривителлиновых липидов (Bradley, Swann, 2019).

На средах KSOM (mKSOM, KSOMaa и KSOM-R) эффективно развиваются ранние зародыши мыши (Belli et al., 2019), крысы (Men et al., 2020), крупного рогатого скота (Nedambale et al., 2004), кролика (Liu et al., 1996), овцы (Aghaz et al., 2016), свиньи (Machaty et al., 1998) и верблюда (Yaqoob et al., 2017). Среда HECM и созданная на ее основе R1ECM применяются для развития ранних зародышей мышей (Брусенцев и др., 2015), хомячков (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015; Seshagiri, Vani, 2019), крыс (Miyoshi et al., 1995; Igonina et al., 2019) и макак (Zhou et al., 2006). Можно выделить и другие среды-кандидаты на “универсальность”, на которых можно успешно культивировать *in vitro* преимплантационные эмбрионы различных видов млекопитающих, такие как G1/2, SOF и CZB. Среда G1/2 или G1.2/2.2 используется для культивирования эмбрионов мыши (Finger et al., 2015), лошади (Choi et al., 2003a), КРС (Lane et al., 2003), козы (Hosseini et al., 2015) и свиньи (Swain et al., 2001). Различные модификации среды SOF (SOFaa, SOF1/2 и другие) используется для культивирования *in vitro* эмбрионов КРС (Nedambale et al., 2004), овцы (Mara et al., 2014), козы (Hosseini et al., 2015), ламы (Trasorras et al., 2014), собаки (Rodrigues et al., 2004) и кошки (Sananmuang et al., 2011). На среде CZB развиваются ранние зародыши мыши (Chatot et al., 1990), лошади (Choi et al., 2003b), козы (Izquierdo et al., 1999), свиньи (Pollard et al., 1995) и хорька (Li et al., 2001). Однако какой бы сбалансированной не была искусственная питательная среда для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов, она все равно остается субоптимальной, в частности, потому, что на развитие эмбрионов *in vivo* воздействуют различные гормоны и факторы роста, как уже было сказано ранее (Aguilar, Reyley, 2005).

Включение отдельных факторов роста или их комбинации в культуральную среду *in vitro* способствует улучшению раннего эмбрионального развития и увеличению доли имплантирующихся зародышей (Kawamura et al., 2012; Брусенцев и др., 2014). Ряд исследований указывает на ускорение развития преимплантационных эмбрионов млекопитающих при добавлении таких ростовых факторов, как IGF-1 (Кожевникова и др., 2017), EGF (Брусенцев и др., 2015), GM-CSF (Amstislavsky et al., 2015) и других, а также комбинации нескольких факторов роста (Kawamura et al., 2012). Стимулирующее воздействие на развитие эмбрионов млекопитающих *in vitro* оказывают также хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), бета-эндорфин, инсулин и другие гормоны (Брусенцев и др., 2014; Dinopoulou et al., 2016).

*Влияние физико-химических параметров
культивирования на развитие
преимплантационных эмбрионов
млекопитающих in vitro*

Такие условия, как температура, влажность, pH культуральной среды, состав газовой смеси, поддерживаемые в лабораторных CO₂-инкубаторах, могут существенно повлиять на развитие эмбрионов (Брусенцев и др., 2014). Основным правилом эмбриологической лаборатории является поддержание стабильности среды, где происходит культивирование эмбрионов *in vitro*: необходимо минимизировать число манипуляций и наблюдений за эмбриологическим материалом вне CO₂-инкубатора, чтобы снизить стресс для дробящихся зародышей (Miller, 2014).

Температурный контроль, а также контроль влажности в CO₂-инкубаторе, является наиболее важным для системы культивирования, так как развивающиеся эмбрионы очень чувствительны к перепадам температуры (Miller, 2014). В настоящий момент наиболее оптимальной температурой для поддержания развития ранних зародышей вне организма считается температура около 37°C (Swain et al., 2016), а также влажность около 90% (Higdon et al., 2008). Кроме того, необходимо учитывать, что в каждом конкретном CO₂-инкубаторе температура неравномерно распределена, и существуют “холодные” и “горячие” зоны, где температура может различаться (Miller, 2014).

Важнейшим показателем для поддержания развития преимплантационных эмбрионов вне организма матери является pH культуральной среды (Брусенцев и др., 2014). Компоненты питательных сред, а также состав газовой смеси инкубатора, подбирают таким образом, чтобы обеспечить pH в интервале 7.2–7.4 (Брусенцев и др., 2014). Основным компонентом питательной среды, который регулирует данный показатель, является бикарбонат натрия, который обычно добавляется в среду в концентрации 25 мМ (Брусенцев и др., 2014). Инкубатор поддерживает pH на нужном уровне благодаря постоянному содержанию в нем 5–7% CO₂ (Higdon et al., 2008).

Оптимальный состав газовой смеси оказывает большое влияние на результативность культивирования преимплантационных эмбрионов *in vitro* (Брусенцев и др., 2014). Часто газовый состав в инкубаторе содержит 5% CO₂ и 95% воздуха (Higdon et al., 2008). *In vivo* эмбрионы млекопитающих находятся в среде, где содержание кислорода в 2.5 и более раз ниже, чем в атмосфере (Fischer, Bavister, 1993; Menezo et al., 2013). Было показано, что высокое содержание O₂ ухудшает развитие эмбрионов, приводит к повышению частоты возникновения нарушений в митохондриях, высокому уровню активных форм кислорода, а также может влиять

на процессы расхождения хромосом (Menezo et al., 2013; Belli et al., 2019). В эксперименте было показано, что снижение содержания кислорода в газовой смеси с 20 до 5% при культивировании эмбрионов мышей существенно улучшает их развитие (Belli et al., 2019). Кроме того, некоторые летучие органические соединения (стирол, формальдегид, глутаровый альдегид, толуол), а также микроорганизмы в воздухе лаборатории, могут оказывать негативное влияние на процесс культивирования эмбрионов (Miller, 2014).

Культивирование in vitro преимплантационных эмбрионов человека

Результаты исследований, полученных на различных видах животных, учитывают и при создании сред для культивирования *in vitro* эмбрионов человека (Брусенцев и др., 2014). Большой прогресс достигнут в оптимизации культуральных сред, используемых в медицине (Youssef et al., 2015). Важное значение для культивирования *in vitro* эмбрионов человека является развитие двухступенчатых сред – sequential media, а также переход к одноступенчатому протоколу – single media (Morbeck et al., 2014, 2017). Состав некоторых фирменных питательных сред, используемых на сегодняшний день в репродуктивной медицине, представлен в табл. 2.

Двухступенчатый метод был создан исследователями с использованием подхода “back-to-nature” для максимального приближения условий культивирования к естественным условиям среды с меняющимся составом (Gardner, 1998; Gardner, Lane, 2014). По отношению к культивированию *in vitro* ранних зародышей человека были разработаны следующие двухступенчатые питательные среды: 1) G1/2 от компании Vitrolife, Швеция; 2) QACM/QABM от компании CooperSurgical (SAGE), Дания; 3) SICM/SIBM от компании Cook, США; 4) IVC1/IVC3 от компании InVivoCare, США; 5) ISM1/BA от компании CooperSurgical (Origio), Дания (Morbeck et al., 2014). Позднее, используя подход “let embryo choose”, исследователями были разработаны одноступенчатые питательные среды, которые подходят как для ранних, так и для более поздних стадий развития (Morbeck et al., 2017). К этим средам относятся: 1) Global от компании CooperSurgical (LifeGlobal), Дания; 2) CSC от компании FUJIFILM Irvine Scientific, Япония; 3) G-TL от компании Vitrolife, Швеция; 4) 1-Step от компании CooperSurgical (Origio), Дания (Morbeck et al., 2017). Такие среды позволяют совершать меньше манипуляций с эмбрионами и таким образом сводить к минимуму вероятность повреждений (Dieamant et al., 2017).

По аналогии со средами для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млеко-

Таблица 2. Состав некоторых синтетических питательных сред, наиболее часто используемых при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов человека

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов, мМ, за исключением сноски)																
	G1/2 ^{1,3}		QACM/QABM ¹		SICM/SIBM ¹		IVC1/IVC3 ^{1,3}		ISM1/BA ¹		Global ^{1,2}		CSC ^{1,2}		G-TL ²		1-Step ²
Кальций	1.1	1.1	2.2	1.1	1.1	1.1	2.1	1.9	1.8	1.4	1.6	1.9	1.0	1.0	2.1		
Фосфор	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	—	0.3	0.3	1.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3		
Калий	5.8	5.8	4.7	4.8	5.0	5.0	4.6	4.9	8.4	5.3	2.8	2.8	5.5	5.5	2.9		
Хлор	124.0	127.0	118.0	122.0	121.0	107.0	108.0	108.0	116.0	114.0	108.0	112.0	106.0	106.0	112.0		
Натрий	152.0	149.0	132.0	140.0	136.0	142.0	143.0	143.0	131.0	144.0	138.0	138.0	137.0	137.0	132.0		
Магний	1.7	1.7	1.8	1.5	1.5	0.2	0.2	0.2	0.9	0.8	0.2	0.8	1.6	1.6	1.8		
Железо	—	3.0**	1.0**	11.0**	9.0**	5.0**	5.0**	5.0**	9.0**	57.0**	—	4.0**	—	—	—		
Селен	—	—	—	3.0**	3.0**	—	—	—	4.0**	4.0**	—	—	—	—	—		
Алюминий	1.0**	1.0**	18.0**	1.0**	1.0**	2.0**	6.0**	6.0**	5.0**	16.0**	1.0**	—	—	—	—		
Хром	0.1**	0.2**	0.2**	0.3**	0.3**	0.7**	0.9**	0.9**	0.2**	1.2**	0.4**	0.7**	—	—	—		
Кобальт	0.3**	0.2**	0.2**	0.3**	0.2**	0.2**	0.2**	0.2**	0.5**	0.6**	0.1**	0.2**	—	—	—		
Марганец	0.5**	0.6**	3.6**	0.5**	0.5**	0.6**	0.6**	0.6**	1.4**	0.8**	0.4**	0.8**	—	—	—		
Глюкоза	0.5	3.4	0.1	0.3	3.1	—	2.7	1.0	1.0	1.0	0.2	0.5	1.0	1.0	0.2		
Цитрат	0.080	0.080	—	—	—	—	0.200	0.200	0.020	0.003	—	0.020	0.010	0.010	—		
Октонат	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7	0.3	0.3	0.3	0.4		
Лактат	10.8	6.0	3.9	1.8	1.8	10.1	9.4	3.2	2.4	2.4	4.9	5.7	10.0	10.0	4.4		
Пируват	0.3	0.1	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	2.0	2.0	0.2	0.2	0.3	0.6	0.6	0.2		
Аргинин	—	360.0 [#]	—	25.0 [#]	252.0 [#]	—	590.0 [#]	138.0 [#]	124.0 [#]	292.0 [#]	278.0 [#]	324.0 [#]	336.0 [#]	336.0 [#]	336.0 [#]		
Цистеин	—	54.0 [#]	—	2.0 [#]	32.0 [#]	—	9.0 [#]	42.0 [#]	38.0 [#]	34.0 [#]	32.0 [#]	26.0 [#]	28.0 [#]	28.0 [#]	28.0 [#]		
Гистидин	—	121.0 [#]	—	8.0 [#]	86.0 [#]	—	188.0 [#]	99.0 [#]	54.0 [#]	80.0 [#]	76.0 [#]	80.0 [#]	89.0 [#]	89.0 [#]	90.0 [#]		

Таблица 2. Окончание

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов, мМ, за исключением сноски)											
	G1/2 ^{1,3}	QACM/QABM ¹	SICM/SIBM ¹	IVC1/IVC3 ^{1,3}	ISM1/BA ¹	Global ^{1,2}	CSC ^{1,2}	G-TL ²	1-Step ²			
Изолейцин	—	209.0 [#]	17.0 [#]	169.0 [#]	—	388.0 [#]	147.0 [#]	208.0 [#]	182.0 [#]	199.0 [#]	215.0 [#]	204.0 [#]
Лейцин	—	227.0 [#]	18.0 [#]	182.0 [#]	—	408.0 [#]	158.0 [#]	217.0 [#]	177.0 [#]	188.0 [#]	204.0 [#]	206.0 [#]
Лизин	—	223.0 [#]	18.0 [#]	174.0 [#]	—	417.0 [#]	148.0 [#]	179.0 [#]	154.0 [#]	168.0 [#]	182.0 [#]	182.0 [#]
Метионин	—	56.0 [#]	4.0 [#]	43.0 [#]	—	100.0 [#]	89.0 [#]	54.0 [#]	44.0 [#]	50.0 [#]	54.0 [#]	54.0 [#]
Фенилаланин	—	106.0 [#]	8.0 [#]	86.0 [#]	—	200.0 [#]	90.0 [#]	104.0 [#]	79.0 [#]	83.0 [#]	91.0 [#]	92.0 [#]
Треонин	—	210.0 [#]	18.0 [#]	172.0 [#]	—	374.0 [#]	81.0 [#]	211.0 [#]	162.0 [#]	176.0 [#]	184.0 [#]	204.0 [#]
Триптофан	—	28.0 [#]	2.0 [#]	22.0 [#]	—	51.0 [#]	100.0 [#]	21.0 [#]	18.0 [#]	20.0 [#]	21.0 [#]	23.0 [#]
Тирозин	—	100.0 [#]	12.0 [#]	114.0 [#]	—	186.0 [#]	70.0 [#]	91.0 [#]	69.0 [#]	75.0 [#]	80.0 [#]	83.0 [#]
Валин	—	224.0 [#]	17.0 [#]	179.0 [#]	—	428.0 [#]	356.0 [#]	225.0 [#]	163.0 [#]	174.0 [#]	200.0 [#]	196.0 [#]
Аланин	148.0 [#]	—	135.0 [#]	135.0 [#]	—	136.0 [#]	338.0 [#]	124.0 [#]	46.0 [#]	48.0 [#]	63.0 [#]	38.0 [#]
Аспарагин	126.0 [#]	112.0 [#]	88.0 [#]	84.0 [#]	—	113.0 [#]	73.0 [#]	104.0 [#]	42.0 [#]	46.0 [#]	40.0 [#]	36.0 [#]
Аспаргат	—	93.0 [#]	81.0 [#]	85.0 [#]	—	95.0 [#]	6.0 [#]	578.0 [#]	42.0 [#]	43.0 [#]	12.0 [#]	58.0 [#]
Глутамат	—	—	90.0 [#]	87.0 [#]	—	103.0 [#]	1.0 [#]	102.0 [#]	40.0 [#]	41.0 [#]	—	49.0 [#]
Глутамин	—	—	30.0 [#]	26.0 [#]	—	—	778.0 [#]	—	—	—	10.0 [#]	36.0 [#]
Глицин	135.0 [#]	119.0 [#]	6647.0 [#]	4815.0 [#]	—	121.0 [#]	1760.0 [#]	701.0 [#]	42.0 [#]	44.0 [#]	185.0 [#]	48.0 [#]
Пролин	112.0 [#]	93.0 [#]	85.0 [#]	80.0 [#]	—	99.0 [#]	82.0 [#]	96.0 [#]	55.0 [#]	60.0 [#]	126.0 [#]	66.0 [#]
Серин	127.0 [#]	107.0 [#]	92.0 [#]	89.0 [#]	—	109.0 [#]	96.0 [#]	113.0 [#]	40.0 [#]	42.0 [#]	96.0 [#]	46.0 [#]
Таурин	131.0 [#]	122.0 [#]	6489.0 [#]	6380.0 [#]	—	—	296.0 [#]	—	—	—	48.0 [#]	—
САа	4.0 [*]	5.0 [*]	5.0 [*]	5.0 [*]	4.0 [*]	1.0 [*]	5.0 [*]	5.0 [*]	10.0 [*]	5.0 [*]	5.0 [*]	5.0 [*]

^a Сывороточный альбумин, * — мг/л, ** — мкг/л, [#] — мкМ; ¹ Morbeck et al., 2014; ² Morbeck et al., 2017; ³ Tarahomi et al., 2019.

питающих, в клинике также используют добавление некоторых гормонов и факторов роста с целью повышения эффективности ВРТ (Ziebe et al., 2013). Учитывая сложный каскад молекулярных взаимодействий между эндометрием и эмбрионом (Makieva et al., 2018), был применен другой подход к оптимизации систем культивирования, а именно со-культивирование эмбрионов с аутологичными эндотелиальными клетками эндометрия (Le Saint et al., 2019). В недавнем клиническом исследовании было показано, что такой способ культивирования существенно увеличивает процент получения бластоцист хорошего качества по сравнению с традиционным методом (Le Saint et al., 2019). Однако, такой подход является технически сложным и дорогостоящим, что затрудняет его внедрение в клиническую практику.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO* И ВЛИЯНИЕ НА ПОСЛЕДУЮЩИЙ ОНТОГЕНЕЗ

Пять десятилетий назад, в самом начале истории культивирования эмбрионов лабораторных животных, было показано, что развитие преимплантационных зародышей мышей *in vitro* происходит значительно медленнее по сравнению с их развитием *in vivo* (Bowman, McLaren, 1970). Однако, следует отметить, что такие результаты были получены не в самых благоприятных для культивирования условиях, а именно, с использованием питательных растворов, которые изначально были разработаны для выращивания соматических клеток, а не эмбрионов, с несбалансированными концентрациями компонентов и в отсутствие CO₂ инкубаторов. В некоторых работах, в частности, в исследовании Шварцер с соавторами (2012) было выявлено, что *in vitro* эмбрионы мыши развивались даже лучше, чем *in vivo*, показателем чего было повышение частоты формирования бластоцист и индекса имплантации (Schwarzer et al., 2012). Также, в этой работе было изучено влияние культуральной среды на транскриптом эмбрионов и число клеток в бластоцистах, и сделан вывод о том, что сама по себе процедура извлечения эмбрионов с последующим эмбриотрансфером снижает качество эмбрионов и изменяет их транскриптом (Schwarzer et al., 2012). Ранее было показано, что такие рутинные манипуляции с эмбрионами приводят к aberrантной экспрессии некоторых импринтированных генов в эмбриональных и внезародышевых тканях в постимплантационном периоде (Rivera et al., 2008). Интересно отметить, что пипетирование эмбрионов активирует стресс-чувствительные киназы MARK8/9, которые влияют на пролиферацию клеток и вовлечены в индукцию апоптоза (Xie et al., 2007). Исследователи предполагают, что

эпигенетические дефекты, наблюдаемые при переносе эмбрионов, могут быть результатом активации стресс-чувствительных MAP-киназ (Rivera et al., 2008).

В условиях *in vitro* на развитие эмбрионов влияет накопление аммония вследствие распада нестабильного L-глутамина (Biggers et al., 2004; Men et al., 2020). В современных версиях KSOM для того, чтобы снизить накопление аммония, вместо L-глутамин часто используют более стабильные дипептиды, такие как L-аланин-L-глутамин (AlaGln) и L-глицин-L-глутамин (GlyGln) (Biggers et al., 2004). Интересно, что при культивировании эмбрионов крыс процент развивающихся бластоцист стремительно падает при такой замене (Gln → AlaGln/GlyGln), в отличие от мышей (Men et al., 2020). Авторы связывают эти негативные эффекты с неправильно подобранной концентрацией дипептидов, которая подходит лишь для мышей, а также с возможной неспособностью крысиных эмбрионов эффективно утилизировать эти вещества, вследствие низкой аффинности их дипептидаз (Men et al., 2020). В случае культивирования эмбрионов крыс предлагают другие способы избежать накопления аммония, например, заменять культуральную среду на новую каждые 24 ч (Nakamura et al., 2016), либо увеличивать ее объем (Men et al., 2020).

Условия культивирования *in vitro* эмбрионов млекопитающих влияют на темпы их развития, что проявляется в изменении числа клеток в бластоцистах, а также нарушении экспрессии генов и развития плода (Mani, Manigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019). Более подробно влияние культивирования на эпигеном, а также на постимплантационное развитие плода описано в следующих подразделах. Так, в эндометрии человека показана экспрессия большого числа цитокинов, поддерживающих развитие ранних зародышей (Kawamura et al., 2012). Данные последних лет свидетельствуют о том, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов сопровождается изменением экспрессии некоторых генов (Sunde, 2019).

Влияние культивирования in vitro на изменение экспрессии генов в преимплантационных эмбрионах лабораторных животных

К настоящему времени на эмбрионах различных видов млекопитающих получены данные, указывающие на значительные изменения в паттерне экспрессии генов, обусловленные применением ВРТ (de Waal et al., 2014). Однако в большинстве работ исследовали совокупный эффект ВРТ на фенотип и экспрессию генов, но не вклад отдельных этапов (de Waal et al., 2014; Feuer et al., 2016). Кроме того, исследования на мышах показали значительное влияние на результат культи-

вирования межлинейных различий (de Waal et al., 2014).

В работе о влиянии различных этапов *in vitro* процедур на состояние транскриптома blastоцист и взрослых потомков, показано, что именно условия культивирования, и в первую очередь, концентрация кислорода, провоцируют наибольшие отклонения экспрессии генов в blastоцистах мышей (Feuer et al., 2016). При этом каждая комбинация исследованных процедур характеризуется своим уникальным профилем экспрессии, ассоциированным с различными сигнальными и метаболическими путями (Feuer et al., 2016).

Наибольшее внимание исследователей сосредоточено на эффектах ВРТ по отношению к эпигенетической регуляции экспрессии генов, и в частности, на нарушениях геномного импринтинга в ходе раннего развития эмбриона (Market-Velker et al., 2010). Именно в контексте фактора состава среды для культивирования, одним из наиболее показательных можно считать исследование на мышах, в котором проводят параллельное сравнение пяти коммерческих культуральных сред (KSOMaa, Global, HTF, P1/MB и G1.5/G2.5) в сравнении с наиболее бедной средой Whitten's и условиями *in vivo* (Market-Velker et al., 2010). Анализ метилирования и экспрессии трех импринтируемых локусов, *H19*, *Peg3* и *Snrpn*, при культивировании до стадии blastоцисты показал, что во всех шести средах происходит утрата как отцовского (*H19*), так и материнского (*Peg3* и *Snrpn*) импринтинга, хотя и в разной степени, что позволило ранжировать среды по приближенности к условиям *in vivo* (Market-Velker et al., 2010).

Масштабные изменения в профилях метилирования и экспрессии генов эмбриона в результате культивирования были показаны с помощью полногеномных методов. Так, с помощью RNA-seq и RBAT-seq было показано, что культивирование эмбрионов свиньи в сравнении с *in vivo* условиями приводит к изменению паттернов метилирования и экспрессии генов, связанных с репрограммированием, импринтингом и развитием клеток (Canovas et al., 2017). Более того, добавление в культуральную систему содержимого репродуктивных путей приводило к менее выраженным отклонениям экспрессии генов и эпигеноме на стадии blastоцисты, что обусловлено, в частности, предотвращением деметилирования локуса *IGF2R*, непосредственно ассоциированного с синдромом крупного потомства (Canovas et al., 2017).

На модели мышей совместный эффект *in vitro* оплодотворения и культивирования на транскриптом и эпигеноме экстраэмбриональных и плацентарных тканей был исследован с помощью RNA-seq и MeDIP-seq (Tan et al., 2016). Было выявлено 409 генов, экспрессия которых была изменена в соответствии с гипо- или гиперметилированием их

промоторов в ответ на *in vitro* процедуры (Tan et al., 2016). Выявленные гены функционально связаны с формированием цитоскелета, развитием сосудов, органов и метаболизмом всего организма. Было также показано, что степень гипометилирования генома в эмбрионах КРС более выражена при увеличении длительности их культивирования *in vitro* (Salilew-Wondim et al., 2015).

Влияние культивирования in vitro на изменения в профиле экспрессии генов и эпигеноме эмбрионов человека

Значительное влияние состава культуральной среды на профиль экспрессии генов показано и на эмбрионах людей (Kleijkers et al., 2015). В частности, было выявлено, что культивирование ранних зародышей человека в достаточно простой среде HTF по сравнению с богатой многокомпонентной средой Vitrolife G5 Plus приводит на стадии blastоцисты к значительному изменению экспрессии 951 гена, большинство которых ассоциировано с апоптозом, деградацией белка, метаболизмом и контролем клеточного цикла, что, в частности, выражается в двукратном снижении частоты имплантации (Kleijkers et al., 2015). Очевидно, что стадия развития эмбриона и возраст донора играют заметную роль в наблюдаемых изменениях транскриптома при сравнении вышеупомянутых культуральных сред (Mantikou et al., 2016). Однако такой результат являлся вполне ожидаемым, поскольку среда HTF предназначена лишь для созревания ооцитов и, собственно, оплодотворения. Намного больший интерес представляют собой сравнение влияния сред, предназначенных для культивирования эмбрионов со стадии зиготы до момента переноса эмбриона в матку, на транскриптом blastоцист одного класса, однако, в связи с этическими ограничениями, проведение таких исследований затруднено. Морбек с коллегами (2017) провели детальные исследования состава культуральных сред CSC, Global, G-TL и 1-Step, которые используются в репродуктивной медицине (Morbeck et al., 2017). Было показано, что эти среды существенно различны по концентрации пирувата, лактата и составу аминокислот (Morbeck et al., 2017). Более того, было обнаружено, что состав сред, а также концентрация кислорода, достоверно влияет на процент развития blastоцист (Morbeck et al., 2017).

Стоит отметить, что в упомянутых работах подчеркивается выраженная стохастичность наблюдаемых изменений в транскриптом и эпигеноме эмбрионов, что может также отражать значительное влияние других биологических факторов на системы регуляции экспрессии генов ранних зародышей, помимо условий их культивирования (Mani, Mainigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019). Более детально влияние различных факторов культивиро-

вания на эпигеном эмбриона описано в соответствующих обзорных работах (Mani, Mainigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019).

Влияние культивирования in vitro ранних эмбрионов млекопитающих на их постимплантационное развитие

Условия оплодотворения и раннего преимплантационного развития эмбриона *in vivo* и *in vitro* существенно отличаются друг от друга (Summers, Biggers, 2003). Различные компоненты питательных сред и другие факторы культивирования способны нарушить формирование бластоцисты, вызвать уменьшение числа клеток во внутренней клеточной массе и изменения в экспрессии генов, которые впоследствии могут повлиять на течение беременности (Ramos-Ibeas et al., 2019). В частности, после процедуры ЭКО с последующим культивированием преимплантационных эмбрионов мыши на таких питательных средах как KSOMaa и Whitten's, повышается частота выкидышей (Delle Piane et al., 2010). Однако, в другой работе после культивирования эмбрионов мышей по 13 протоколам, используемым в настоящее время в клинике, не было отмечено повышенной частоты выкидышей (Schwarzer et al., 2012). Более того, в некоторых протоколах было отмечено снижение этого явления (Schwarzer et al., 2012). Также у разных видов млекопитающих после применения ВРТ, в том числе после культивирования *in vitro*, обнаруживается ограничение роста плода на ранних сроках беременности, однако, на более поздних ее этапах, наблюдается как значительное увеличение размера плаценты, так и ускорение развития плода (Delle Piane et al., 2010; Bloise et al., 2012, 2014). Это компенсаторное увеличение размеров плаценты в ответ на внутриутробную задержку роста у зародышей после применения ВРТ обеспечивает, вероятно, дополнительную поддержку плода (Bloise et al., 2014).

Противоречивые данные получены на мышах по влиянию ВРТ, и, в частности, культивирования *in vitro*, на изменение уровня апоптоза в плаценте (Raunig et al., 2011; Bloise et al., 2012). Одни исследователи показали усиление апоптоза после процедур ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида – ИКСИ (Raunig et al., 2011), другие такого изменения не обнаружили (Bloise et al., 2012). Также показана связь ВРТ с изменениями в транскриптоме плаценты у мышей (Delle Piane et al., 2010; Fauque et al., 2010), а также снижением плотности кровеносных сосудов в ней у КРС (Miles et al., 2005). Исходя из вышесказанного, можно заключить, что воздействие, которым подвергается преимплантационный эмбрион при проведении ВРТ, в частности, в период культивирования *in vitro*, оказывают влияние на дальнейшее пренатальное развитие плода,

а также, как показывают другие исследования, могут иметь отдаленные последствия в постнатальном онтогенезе у животных (Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018; Sunde, 2019).

Влияние культивирования in vitro эмбрионов человека на их постимплантационное развитие

Влияние ВРТ на постимплантационное развитие было показано и у человека, при этом отклонения были подобны тем, что обнаружены на животных, в частности, в некоторых случаях, наблюдалась внутриутробная задержка роста плода, компенсаторное увеличение размеров плаценты и вероятность возникновения микрокальцинаций (Joy et al., 2012; Naavaldsen et al., 2012; Nelissen et al., 2013). Однако, частота спонтанных аборт при применении ВРТ в целом оставалась такой же, как и после естественного зачатия, хотя данных, включающих в себя сопутствующие факторы материнского возраста и другие, недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод (Bloise et al., 2014). Новорожденные, зачатые с использованием ВРТ, чаще рождаются преждевременно и имеют низкую массу тела при рождении по сравнению с зачатыми естественным путем (Pandey et al., 2012; Wennerholm et al., 2020). Перинатальная смертность и врожденные аномалии в таких случаях также встречаются достоверно чаще, чем при спонтанной беременности (Pandey et al., 2012).

Несколько работ посвящено сравнению различных протоколов культивирования эмбрионов, которые используются в настоящее время в клинике, на внутриутробное развитие и перинатальные исходы (Zandstra et al., 2015). Однако, из 11 работ по этой теме, только в пяти было показано, что среды разных производителей могут влиять на массу тела ребенка при рождении, в шести эффекта не наблюдали (Zandstra et al., 2015).

Таким образом, качественный и количественный состав питательной среды, предназначенной для культивирования *in vitro* эмбрионов различных видов млекопитающих, в том числе и человека, а также другие условия, например, парциальное давление кислорода, могут оказывать влияние на эффективность развития преимплантационных зародышей. Исследования в данном направлении до сих пор являются актуальными, и нуждаются в продолжении.

ВЛИЯНИЕ ВРТ НА ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Согласно гипотезе “Онтогенетического происхождения здоровья и болезней” (Developmental Origins of Health and Disease) определенные нарушения у взрослых организмов зависят от условий их пренатального развития, в частности, от пита-

ния матери и, соответственно, зародыша во время беременности (Barker, 2007). В современном понимании этой гипотезы, она также касается периодов преимплантационного развития и имплантации (Fleming et al., 2015). В этой связи, весьма существенное влияние на раннее развитие зародышей может оказывать питательная среда, используемая для оплодотворения и культивирования *in vitro* (Sunde et al., 2019).

Исследования на животных показывают, что метаболизм у взрослых особей зависит от условий, с которыми они сталкиваются на преимплантационной стадии развития. ЭКО и культивирование *in vitro* ранних зародышей могут приводить к преобразованию траектории роста и развития организма, а на более поздних этапах онтогенеза, к нарушению липидного и углеводного метаболизма мышей (Bloise, 2014; Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018). Так, небольшие изменения в соотношении пирувата и лактата в культуральной среде оказывают влияние на митохондриальную активность в зиготах и имеют долгосрочные последствия на вес потомков при рождении и дальнейший постнатальный рост у мышей (Banrezes et al., 2011). В другом исследовании было показано, что культивирование эмбрионов мышей в субоптимальной среде Whitten's при содержании кислорода в газовой смеси 20% приводило к усиленному постнатальному росту у самцов, сниженной толерантности к глюкозе и увеличенному левому желудочку сердца, тогда как при оптимальных условиях культивирования (KSOMaа и 5% O₂) изменений у потомков не наблюдалось (Donjacour et al., 2014). В то же время имеются данные, указывающие на то, что использование как субоптимальной среды Whitten's, так и оптимальной среды KSOMaа для культивирования эмбрионов мышей приводило к изменению траектории постнатального роста, накоплению жира, повышению гипергликемии и нарушению функции поджелудочной железы у взрослых особей (Feuer et al., 2014). Кроме того, у мышей после процедур ЭКО и ИКСИ на среде CZB выявлены нарушения углеводного обмена: у потомков наблюдался больший вес при рождении и снижение толерантности к глюкозе, а также повышенная резистентность к инсулину (Scott et al., 2010). Полученные в этом исследовании результаты по весу при рождении противоречат некоторым исследованиям на людях, поскольку в некоторых случаях у детей, зачатых с помощью ВРТ вес при рождении не выше, а ниже, чем у детей после естественного зачатия (Wennerholm, Bergh, 2020). Данное противоречие может быть объяснено тем, что в отличие от человека, у мышей величина помета может существенно снижаться после ВРТ, за счет чего зародыши получают больше питательных веществ, а также использованием для экспериментов молодых и здоровых самок для вынашивания

беременностей, в то время как в клинику ВРТ обращаются люди с репродуктивными проблемами.

ЭКО и культивирование эмбрионов *in vitro* может вызывать некоторые изменения в развитии и функционировании сердечно-сосудистой системы. Культивирование *in vitro* эмбрионов мышей, начиная с двухклеточной стадии, приводило к повышенному артериальному давлению, связанному с повышенной активностью ангиотензин-превращающего фермента в сыворотке крови у самок в возрасте 27 нед. (Watkins et al., 2007). В другом исследовании было показано, что эндотелиальная дисфункция и повышенное артериальное давление (АД) у самцов мышей, полученных после применения ВРТ, сопровождалось изменениями в метилировании промотора гена, кодирующего eNOS в аорте, что коррелировало со сниженной экспрессией eNOS в сосудах и сниженным синтезом NO (Rexhaj et al., 2013). Однако, использование субоптимальной среды Whitten's приводило к снижению систолического давления у самцов мышей (Donjacour et al., 2014). В исследовании на гипертензивных крысах линии НИСАГ было показано, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов в среде mR1ECM приводило к смягчению артериальной гипертензии, характерной для животных данной линии (Igonina et al., 2019). Эти расхождения в результатах исследователей могут быть связаны с различиями в экспериментальном дизайне, методах измерения артериального давления и генетическими характеристиками лабораторных животных.

В работах на мышах также находят различные поведенческие отклонения в постнатальном онтогенезе у животных рожденных после применения методов ВРТ (Ecker et al., 2004; Fernandez-Gonzalez et al., 2004). В частности, оплодотворенные *in vivo* эмбрионы инкубировали в среде KSOM с добавлением 10% фетальной сыворотки, при этом показана задержка в прорезывании резцов и созревании двигательной активности потомков в раннем постнатальном периоде развития, а также ухудшение долговременной памяти в возрасте 21 дня, сниженная тревожность в 5-месячном возрасте с последующим ее повышением в возрасте 15 мес. (Fernandez-Gonzalez et al., 2004). В другом исследовании у взрослых мышей, полученных из *in vivo* оплодотворенных и прокультивированных в средах KSOM и Whitten's эмбрионов, в возрасте 4–5 мес. наблюдалась сниженная тревожность, ухудшение пространственной памяти и увеличение локомоторной активности (Ecker et al., 2004). Однако, у потомков, полученных после использования среды HTF для культивирования эмбрионов мыши до стадии бластоцисты, никакого влияния на способность к обучению не выявлено (Li et al., 2011).

Таким образом, исследования на лабораторных моделях дают возможность оценки эффектов процедур ВРТ на долгосрочное здоровье и постнатальный фенотип. Тем не менее, важно отметить, что эффекты культуральной среды на лабораторных животных могут различаться в зависимости от генетической модели, выбранной для исследования, от возраста, в котором исследуют эффекты, а также от половой принадлежности потомков.

ВЛИЯНИЕ ВРТ НА ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЧЕЛОВЕКА

Лечение бесплодия у человека с помощью методов ВРТ включает в себя такие основные этапы, как овариальная стимуляция, получение ооцитов и сперматозоидов, ЭКО/ИКСИ, культивирование эмбрионов *in vitro*, а также эмбриотрансфер. Все эти процедуры могут потенциально влиять на развивающийся эмбрион и, следовательно, на будущее здоровье ребенка. Кроме того, эти методы действуют в комплексе, что необходимо учитывать при интерпретации эффектов отдельных этапов ВРТ. Дополнительное влияние на здоровье потомства могут оказывать такие факторы, как собственно бесплодие и сопутствующие заболевания родителей (Jaques et al., 2010; Hayashi et al., 2012), материнский возраст (Kahveci et al., 2018; Pinheiro et al., 2019) и гормональная стимуляция яичников (Klemetti et al., 2010; Labarta et al., 2014). Вопрос о взаимодействии всех этих факторов и их связи с неблагоприятным влиянием на здоровье детей все еще остается открытым.

Следует также отметить, что до сих пор не существует единого “стандартного протокола” проведения ЭКО и культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов в репродуктивной медицине. Различные лаборатории по всему миру используют разные питательные среды для проведения процедур ВРТ (Sunde, 2019). Анализируя фенотип детей, рожденных после культивирования эмбрионов *in vitro* на разных коммерческих средах, некоторые исследователи находят достоверное влияние этого фактора (Dumoulin et al., 2010; Kleijkers et al., 2015), другие же не находят никаких различий (Ziebe et al., 2013). Такое противоречие полученных результатов объясняется крайней сложностью интерпретации клинических данных, поскольку затруднительно провести стандартизацию условий исследования, в частности, еще и потому, что количественный состав компонентов большинства коммерческих сред, используемых в клинике, не предоставляется производителем (Tarahomi et al., 2019). Однако имеются исследования, иллюстрирующие значительные композиционные различия в составах некоторых коммерческих сред (Morbeck et al., 2017; Tarahomi et al., 2019).

Перинатальные характеристики

Исследования последствий применения ВРТ на человеке прежде всего сосредоточены на показателях беременности и живорождений. Дети, зачатые с помощью ВРТ, несколько чаще рождаются недоношенными и имеют низкий для гестационного возраста вес, а также повышенный риск врожденных пороков развития (D'Angelo et al., 2011; Pinborg et al., 2013; Sunkara et al., 2019). Первоначально считалось, что это связано с многоплодной беременностью, но недавно эти риски также подтверждены по сравнению с естественно зачатыми и при одноплодной беременности (Pandey et al., 2012; Wennerholm, Bergh, 2020). Повышенные риски возникновения неблагоприятных перинатальных исходов после применения методов ВРТ связаны, по-видимому, со многими факторами (Sunkara et al., 2019). Ряд исследований указывает на связь неблагоприятных перинатальных исходов с субфертильностью пациентов (Jaques et al., 2010; Hayashi et al., 2012) возрастом родителей (Kahveci et al., 2018; Pinheiro et al., 2019). Между тем, различия по перинатальным исходам между спонтанными и полученными с помощью ВРТ беременностями сохраняются и после исключения влияния данных факторов (Pinborg et al., 2013), что может свидетельствовать о вкладе именно манипуляций в ходе ВРТ.

В частности, такой необходимый этап ВРТ, как овариальная стимуляция может оказывать негативное влияние на перинатальные исходы, даже в случае применения ее у женщин перед естественным зачатием (Klemetti et al., 2010; D'Angelo et al., 2011; Labarta et al., 2014). Одним из подходов является сравнение естественных и полученных с помощью ВРТ беременностей у одной и той же женщины. Такие исследования показывают повышенный риск преждевременных родов после применения ВРТ по сравнению с естественным зачатием (Pinborg et al., 2013), следовательно, факторы, связанные с гормональной стимуляцией и/или методами ВРТ, также могут играть важную роль. Интересную работу проделала немецко-британская группа, в которой была проанализирована выборка женщин, родивших первого ребенка после ИКСИ, а второго после применения данной процедуры, так и в результате естественного зачатия (Ludwig et al., 2008). Не было установлено достоверных отличий по продолжительности беременности, а также по весу новорожденных в обеих группах (Ludwig et al., 2008). В другой работе этих же исследователей было показано повышение частоты крипторхизма у мальчиков, рожденных после ИКСИ, по сравнению с естественно зачатыми (Ludwig et al., 2009a). Однако не было обнаружено никаких существенных различий по остальным показателям здоровья, в том числе по неврологическим отклонениям,

двигательным навыкам, эмоциональному развитию и интеллекту (Ludwig et al., 2009a, 2009b).

Эпигенетические нарушения

Применение методов ВРТ сопряжено с потенциально чувствительным к воздействиям окружающей среды периодом эпигенетического перепрограммирования. Так, первая волна деметилирования-реметилирования происходит во время гаметогенеза, а вторая в течение преимплантационного развития (Zacchini et al., 2019). Анализ уровней метилирования некоторых генов в плаценте показал, что различия метилирования ДНК у детей, зачатых естественным путем и при помощи ВРТ, наблюдаются независимо от наличия родительского бесплодия (Song et al., 2015). Эпигенетические изменения связанные, вероятно, с культивированием *in vitro*, наблюдались также в человеческих гаметах и эмбрионах (El Hajj, Naaf, 2013). Было продемонстрировано, что экспрессия генов в преимплантационных зародышах изменяется в зависимости от культуральной среды, используемой для ЭКО и последующего *in vitro* культивирования (Kleijkers et al., 2015). Однако в другом исследовании пришли к выводу, что на глобальный профиль экспрессии генов в эмбрионе человека большее влияние оказывают такие факторы, как стадия развития эмбрионов и материнский возраст, а не тестируемая среда и условия культивирования (Mantikou et al., 2016).

ВРТ-ассоциированные изменения метилирования ДНК найдены в регионах дифференциально метилированной области (DMR), которые импринтированы во время гаметогенеза и эмбрионального развития (Hiura et al., 2014). По данным метаанализа Лазаравичиут с соавторами (2014), безлени геномного импринтинга, группа редких врожденных расстройств, возникают несколько чаще после применения ЭКО (Lazaraviciute et al., 2014). Установлено, что ВРТ ассоциированы с более высокой вероятностью развития заболеваний, обусловленных нарушениями геномного импринтинга, таких синдромов как Беквита-Видемана (СБВ), Ангельмана, Прадера-Вилли и Сильвера-Рассела (Nattori et al., 2019). Однако в клинической практике это не имеет большого значения. Например, СБВ остается крайне редким заболеванием даже при десятикратном увеличении риска у детей, рожденных после применения ВРТ (Mussa et al., 2017).

Одним из факторов, связанным с нарушением геномного импринтинга является мужская субфертильность. Метаанализ из 24 исследований показал значительное гипометилирование импринтированного гена *H19*, а также гиперметилирование *SNRPN* и *MEST* в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием по сравнению с фертильным контролем (Santi et al., 2017). Дру-

гим фактором, который может влиять на эпигенетическое перепрограммирование в ооцитах, является гормональная индукция овуляции (Sato et al., 2007; Marshall, Rivera, 2018). Однако исследования ооцитов на людях ограничены в связи с небольшим количеством материала и недостатком подходящего контроля, с учетом возраста и общего расстройства оогенеза. Показано, что ооциты на стадии GV и MI, полученные от субфертильных женщин в результате гормональной стимуляции яичников, имеют увеличение метилирования гена *H19* и потерю метилирования в гене *PEG1* (Sato et al., 2007). Кроме того, необходимо учитывать влияние материнского возраста на эпигеном, поскольку известно, что поздний репродуктивный возраст связан с aberrантным глобальным метилированием ДНК в ооцитах и эмбрионах (Marshall, Rivera, 2018). В исследовании Хиура с соавторами (2014) обнаружен клеточный мозаицизм по уровням метилирования у детей с болезнями геномного импринтинга, зачатых с помощью ВРТ, что позволяет предположить, что эти изменения происходят во время первых делений клеток в период культивирования эмбрионов *in vitro* (Hiura et al., 2014). Таким образом, до сих пор неизвестно, когда возникают ошибки геномного импринтинга и какие факторы предрасполагают к эпигенетическим изменениям. Однако, имеется четкая ассоциация между применением ВРТ и специфическими нарушениями импринтинга.

Метаболический синдром

Предпосылки к возникновению у людей отклонений в работе сердечно-сосудистой системы, а также заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма, зачатых с использованием ВРТ, отмечали еще с тех пор, когда гипотеза DONaD была применена к преимплантационному периоду (Fleming et al., 2015, 2018). На протяжении более 40 лет у полученных в результате применения ВРТ потомков было исследовано состояние сердечно-сосудистой системы, сначала у детей, затем подростков и молодых взрослых (Ceelen et al., 2008; Scherrer et al., 2012; Guo et al., 2017; Meister et al., 2018; Halliday et al., 2019).

В одной из первых работ у детей препубертатного возраста (12 лет) было обнаружено небольшое, но достоверное повышение систолического артериального давления (САД) — 109 ± 11 у детей после ВРТ по сравнению с 105 ± 10 мм рт. ст. у естественно зачатых, и диастолического артериального давления (ДАД) — 61 ± 7 у рожденных с применением ВРТ детей по сравнению с 59 ± 7 мм рт. ст. у естественно зачатых (Ceelen et al., 2008). Стоит отметить, что в данной работе в качестве контроля использовалась выборка детей, рожденных у субфертильных родителей, таким образом, влияние родительского фактора бесплодия было ис-

ключено (Ceelen et al., 2008). Однако, несмотря на то что показатели АД были повышены, они оставались в пределах нормы для детей такого возраста (Ceelen et al., 2008).

В систематическом обзоре Гуо с соавторами (2017) был проведен метаанализ данных по артериальному давлению, включающих в себя выборку из 872 детей, зачатых в циклах ЭКО-ИКСИ и 3034 детей, зачатых естественных путем из 10 клинических исследований, в котором была обнаружена небольшая, но достоверная средневзвешенная разница в 1.88 мм рт. ст. по САД, и 1.52 мм рт. ст. по ДАД (Guo et al., 2017). Однако показатель гетерогенности в группах был довольно высоким. Между тем, этот показатель значительно снизился, когда авторы метаанализа стратифицировали выборку по году рождения. Это позволило выявить интересную особенность — дети, рожденные в 1990–1999 гг., имели достоверное повышение как САД (3.75 мм рт. ст.), так и ДАД (2.70 мм рт. ст.), в отличие от группы детей, рожденных в 2000–2009 гг. (0.186 мм рт. ст. — разница по САД и 0.19 мм рт. ст. — разница по ДАД). В дальнейшем авторы оценили вклад факторов более молодого возраста и преобладающего числа детей, зачатых с использованием именно ИКСИ, в 2000–2009 гг., но не обнаружили их влияния. Авторы предположили, что совершенствование программ ВРТ с течением времени, в том числе протоколов стимуляции овуляции и условий культивирования эмбрионов, внесли свой вклад в нивелирование различий по показателям АД между группами (Guo et al., 2017).

В этом же обзоре представлен метаанализ метаболических показателей, таких как уровень инсулина натощак, уровень глюкозы и липидный профиль у детей, зачатых с использованием ВРТ. Кроме того, объединены и проанализированы данные исследований по индексу массы тела (ИМТ), который является одним из диагностических критериев метаболического синдрома (Guo et al., 2017). Метаанализ семи исследований показал, что у детей, зачатых с помощью ЭКО/ИКСИ ($n = 477$), наблюдается более высокий уровень инсулина натощак по сравнению с естественно зачатыми детьми ($n = 185$), но не меняется уровень глюкозы и индекс инсулинорезистентности (Guo et al., 2017). Метаанализ данных пяти исследований показал, что дети, рожденные в результате ВРТ ($n = 332$), имели статистически более низкий уровень липопротеинов низкой плотности по сравнению с детьми, рожденными в результате естественного оплодотворения ($n = 1701$), в то время как уровень липопротеинов высокой плотности не отличался между группами. Таким образом, дети после ВРТ, имели более благоприятный липидный профиль (Guo et al., 2017). Данные 14 исследований, сообщавших об ИМТ (суммарная выборка составила 1914 детей после ЭКО-ИКСИ

и 3881 естественно зачатых), были объединены и проанализированы в том же обзоре: оказалось, что разницы по данному показателю между группами не наблюдалось (Guo et al., 2017).

Интересные результаты были представлены в недавней работе, авторы которой проанализировали уровни важного компонента липидного гомеостаза — пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9) в плазме крови у детей, зачатых с использованием ВРТ ($n = 73$) и естественно рожденных ($n = 73$) (Vlachopoulos et al., 2019). Было показано, что уровень PCSK9 возрастает с возрастом (в пределах двух лет, от восьми до десяти) у детей, рожденных после ВРТ, в то время как у естественно зачатых, напротив, снижается (Vlachopoulos et al., 2019). Возрастание уровня PCSK9 приводит к постепенному ухудшению липидного профиля у таких детей, что ведет к возрастанию рисков сердечно-сосудистых заболеваний (Vlachopoulos et al., 2019). Результаты данного исследования подчеркивают роль показателей липидного обмена как ранних индикаторов скрытых кардиометаболических нарушений в соответствии с методом зачатия (Vlachopoulos et al., 2019). Однако стоит отметить, что размер выборок был небольшим, и не был учтен вклад дополнительных факторов. Для того чтобы сделать однозначный вывод, необходимы дальнейшие исследования с большим размером выборок.

Помимо показателей АД, исследователями изучались структурно-функциональные особенности сердечно-сосудистой системы у детей, зачатых с использованием ВРТ (Scherrer et al., 2012; Valenzuela-Alcazar et al., 2013; Von Arx et al., 2015). В одной из этих работ показано проявление признаков как системной, так и легочной эндотелиальной дисфункции во время препубертатного периода (Scherrer et al., 2012). Позднее было показано, что изменения затрагивают не только АД и функцию сосудов, но и структуру сердца (Valenzuela-Alcazar et al., 2013; Von Arx et al., 2015). Были выявлены признаки ремоделирования сердца и сосудов у плодов и младенцев, зачатых с использованием ВРТ (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Следует отметить, что в данной работе различия между группами сохранялись даже после исключения из выборки детей с низкой массой тела при рождении, так как известно, что фетальное ремоделирование сердца ассоциировано с внутриутробной задержкой роста и соответственно низкой массой тела плода (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Таким образом, авторы предположили, что различия были связаны непосредственно с применением ВРТ, а не перинатальными факторами (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Недавно этой же группой исследователей было показано, что выявленные различия сохраняются до возраста трех лет (Valenzuela-Alcazar et al., 2019).

Однако вопрос о различиях на более поздних этапах жизни все еще остается дискуссионным: некоторые исследователи сообщают о дисфункции левого желудочка у детей 4–5 лет (Zhou et al., 2014; Liu et al., 2015), другие – о дисфункции правого желудочка у детей 12 лет, но проявляющейся только в стрессовых условиях (Von Arx et al., 2015). В недавнем исследовании на предмет признаков эндотелиальной дисфункции и мониторинга АД были протестированы дети подросткового возраста (средний возраст – 16.5 лет) (Meister et al., 2018). Стоит отметить, что в этой работе исследовалась та же когорта детей, что и в предыдущем исследовании с использованием таких же методов; выборки были выравнены по массе тела при рождении и гестационному возрасту, ни у кого из матерей детей из этих выборок не было осложненной беременности, которые бы могли внести свой вклад в отклонение от нормальных параметров функционирования сердечно-сосудистой системы (Scherrer et al., 2012). Оказалось, что спустя пять лет признаки системной эндотелиальной дисфункции у детей сохранились примерно в той же мере (Meister et al., 2018). Более того, 8 из 52 детей в группе ВРТ уже в этом возрасте подходили под критерии артериальной гипертензии первой степени (АД > 130/80 мм рт. ст.). Следует отметить, что в данной работе были исключены недоношенные дети и с низкой массой тела при рождении. Однако ограничениями в этой работе являлся сравнительно небольшой размер выборки (54 человека в группе ВРТ и 40 в контроле), а также то обстоятельство, что все дети являлись пациентами одной клиники (Meister et al., 2018). В противоположность данному исследованию, у молодых людей (22–35 лет) в Австралии в выборках из 193 человек в группе ВРТ и 86 в контрольной группе не было обнаружено каких-либо отклонений в параметрах работы сердечно-сосудистой системы (Halliday et al., 2019).

В связи с тем, что в клинических исследованиях выборки являются неоднородными вследствие влияния огромного числа факторов, вклад которых зачастую невозможно учесть в человеческой популяции, на данном этапе сложно вычленить влияние именно ВРТ, а тем более этапа культивирования эмбрионов. Тем не менее, следует более внимательно отнестись к состоянию здоровья и проводить мониторинг состояния сердечно-сосудистой системы у людей, зачатых в циклах ВРТ. Так как многие из выявленных признаков хоть и находятся в пределах нормы для данных возрастов, но являются прогностическими критериями заболеваний в будущем. Механизмы, лежащие в основе таких отклонений, до сих пор остаются неясными, однако если принять во внимание исследования на лабораторных моделях, можно предположить, что одной из причин могут быть специфиче-

ские изменения в паттернах экспрессии генов в системах регуляции АД (Wang et al., 2018).

Таким образом, в настоящее время накоплены данные по состоянию здоровья детей, рожденных после стандартного комплекса процедур ВРТ, состоящего обычно из ЭКО, либо ИКСИ с последующим культивированием *in vitro* и переносом эмбрионов. У некоторых детей, выявлены ВРТ-ассоциированные отклонения в сердечно-сосудистой, нервной и других системах организма, у них отмечают более высокие показатели систолического и диастолического давления, уровня глюкозы (Ceelen et al., 2008) и инсулина в крови (Guo et al., 2017), снижение периферической чувствительности к инсулину (Chen et al., 2014), а также более высокий коэффициент риска возникновения диабета (Kettner et al., 2016). Помимо этого, у них могут возникать изменения когнитивных способностей и интеллекта (Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017).

Заболевания центральной нервной системы

Несмотря на то, что исследований, в которых пытались установить причинно-следственную связь между применением ВРТ и возникновением неврологических расстройств у детей достаточно много (Klemetti et al., 2006; Maimburg, Vaeth, 2007; Kallen et al., 2010; Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017), лишь в нескольких из этих работ обнаружены предпосылки ее существования. В частности, противоречивые результаты были получены при попытках найти взаимосвязь между применением ВРТ и частотой возникновения детского церебрального паралича – ДЦП (Klemetti et al., 2006; Kallen et al., 2010). В одном из исследований было показано повышение риска возникновения этой патологии после применения ЭКО (Klemetti et al., 2006), однако в другой работе среди одноплодных беременностей статистически достоверного влияния этого фактора обнаружено не было, тем не менее исследователи показали более высокий риск развития ДЦП при вынашивании двойни (Kallen et al., 2010).

Противоречивые результаты были получены и по расстройствам аутистического спектра – РАС (Maimburg, Vaeth, 2007; Lehti et al., 2013; Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017). В ранней работе на относительно небольшой выборке (976 человек) из Дании, за период 1990–1999 гг., было обнаружено снижение риска возникновения аутизма у детей после ВРТ на 59% по сравнению с зачатыми естественным путем (Maimburg, Vaeth, 2007). В другом более позднем исследовании, проведенный анализ истории болезни 16582 детей из Финляндии (рожденных в период 1991–2005 годы), не выявил достоверного влияния ЭКО на частоту РАС (Lehti et al., 2013). Однако наблюдалась достоверная связь данной процедуры с синдромом Аспергера у мальчиков (Lehti et al., 2013). Важно отме-

титель, что работы, связанные с исследованием влияния ВРТ на здоровье, в частности, на развитие нервной системы потомков, довольно гетерогенны по дизайну (Rumbold et al., 2017), например, исследовали смешанные группы детей, не разделенных по способу зачатия – ЭКО/ИКСИ (Pinborg et al., 2003).

Одна из первых работ, в которой разделили группы по способу зачатия (ЭКО или ИКСИ), была проведена в Швеции на обширной выборке более 2.5 миллиона человек, рожденных 1982–2007 гг. (Sandin et al., 2013). В данной работе было обнаружено незначительное повышение риска развития РАС, а также умственной отсталости, у детей, зачатых с использованием более инвазивного метода – ИКСИ, по сравнению с зачатыми путем применения традиционного ЭКО (Sandin et al., 2013). В дальнейшем, этот результат был подтвержден в работе, в которой изучали последствия применения ВРТ в клиниках США (Kissin et al., 2015). Авторы выявили, что 0.9% детей, рожденных с данным диагнозом после ИКСИ и 0.6% после ЭКО (Kissin et al., 2015). В других работах исследователи не выявили различий в неврологических функциях и когнитивных способностях у детей после ЭКО/ИКСИ и одноплодной беременности (Place, Englert, 2003; Ponjaert-Kristoffersen et al., 2004, 2005; Belva et al., 2007; Leunens et al., 2008; Wagenaar et al., 2008). В бельгийской работе на выборке из 66 детей, зачатых с помощью ИКСИ, 52 после ЭКО и 59 в контроле не было выявлено значительных отличий при сравнении этих групп между собой в возрасте трех и пяти лет по вербальным навыкам и IQ, но только при учете уровня родительского образования (Place, Englert, 2003). Другая группа исследователей из Бельгии позднее также не обнаружила значительных отличий по неврологическим показателям у детей в возрасте восьми лет, рожденных после ИКСИ ($n = 150$) по сравнению с естественно зачатыми ($n = 147$), кроме незначительных изменений в тестах на баланс и диадохокинез, которые ВРТ-группа выполняла несколько хуже (Belva et al., 2007). Однако, в тесте на касание кончиков пальцев дети, зачатые с помощью ИКСИ, имели лучшие показатели (Belva et al., 2007). В международном исследовании (на выборке из трех стран мира) при сравнении детей в дошкольном возрасте, рожденных после ИКСИ (300 человек) и естественно зачатых (260 человек) также не было обнаружено различий по итогам теста Векслера (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2004). Позднее эта же группа на выборке детей пятилетнего возраста из пяти европейских стран (ИКСИ, ЭКО и контроль: 511, 424 и 488 человек, соответственно) показала, что способ зачатия (ЭКО или ИКСИ) не оказывает влияние на интеллектуальное развитие ребенка (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005). Тем не менее, авторы уточняют, что такие факторы, как

возраст и образование матери могут влиять на когнитивное развитие детей, рожденных с помощью ВРТ, по сравнению с естественно зачатыми (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005). Эта же группа позднее показала, что дети в возрасте восьми лет, рожденные в Бельгии, из группы ВРТ ($n = 151$) имели более высокий показатель IQ по сравнению с контролем ($n = 153$); авторы связывают это с более высоким уровнем образования их матерей (Leunens et al., 2006). Тем не менее, через два года у этих детей показатели интеллектуального развития выравнивались, что также может быть связано с ослаблением эффекта влияния матери (Leunens et al., 2008). В нидерландской работе, выполненной на выборке из школьников в возрасте 8–18 лет, было проведено исследование влияния ЭКО на когнитивные способности детей (Wagenaar et al., 2008). В результате не было выявлено достоверных отличий между группами ЭКО ($n = 233$) и контролем ($n = 233$) по успеваемости и умственным способностям (Wagenaar et al., 2008). Британские ученые показали, что дети, рожденные в результате ВРТ в возрасте трех и пяти лет, имели более высокие показатели вербальных способностей по сравнению с естественно зачатыми; однако к 11-ти годам эта разница нивелировалась (Barbuscia, Mills, 2017). Данные из представленных работ свидетельствуют в пользу того, что в человеческом обществе более важную роль для формирования когнитивных способностей у ребенка играют социальные факторы в семье, нежели возможное влияние процедуры ВРТ.

В 2017 г. был опубликован первый метаанализ, который включал в себя три популяционных исследования и восемь исследований типа “случай-контроль”, проведенные за период 2006–2015 гг., на разнородной выборке из более восьми миллионов детей, который подтвердил связь применения ВРТ с незначительным повышением риска возникновения РАС у потомков (Liu et al., 2017). Четыре из взятых в анализ исследований были проведены в Европе, четыре в Америке и три в Азии. В работах, которые вошли в данный метаанализ оценивалось влияние либо в целом ВРТ, либо ЭКО или ИКСИ по отдельности. В целом, результаты метаанализа показали, что использование ВРТ может приводить к повышению частоты РАС у детей. Кроме того, в европейских странах, а также среди азиатского населения показана достоверная связь между ВРТ и риском развития РАС. Авторы метаанализа предполагают, что возможно эпигенетические изменения, возникающие вследствие манипуляций с гаметами и эмбрионами, гормональной стимуляции, замораживанием и культивированием эмбрионов и других процедур ВРТ лежат в основе выявленного феномена (Liu et al., 2017). Однако, для подтверждения данной гипотезы, необходимо про-

ведение молекулярно-генетического анализа эмбрионов, полученных *in vitro* (Liu et al., 2017).

Приведенный обзор литературных источников демонстрирует, что данные о влиянии ВРТ на развитие заболеваний ЦНС у людей весьма противоречивы и сложно интерпретируемы. Кроме того, важную роль в постнатальной жизни ребенка играет материнский фактор, здоровье и возраст родителей, а также их уровень образования (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005; Barbuscia, Mills, 2017). Поэтому, для того чтобы корректно оценить влияние тех или иных репродуктивных процедур на перинатальные исходы, необходимо исключить влияние негативных материнских факторов (Sunkara et al., 2019). Исходя из этого, для понимания воздействия данных технологий на организм потомков создают экспериментальные модели на животных (Ramos-Ibeas et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, имеется достаточно много работ, в которых делают попытку установить связь между применением ВРТ и изменением развития как в пренатальном, так и в постнатальном онтогенезе. В настоящее время существует разнообразие питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих, в том числе, человека. Качественный и количественный состав этих сред может оказывать существенное влияние на пре- и постимплантационное развитие зародышей. Несмотря на то, что большинство младенцев после ВРТ здоровы, некоторые исследования показывают, что эти процедуры могут влиять как на перинатальные исходы, так и на долгосрочное здоровье этих детей (Duganthon, Chavatte-Palmer, 2018). Более того, имеются работы, в которых устанавливают взаимосвязь между ВРТ и различными заболеваниями ЦНС у человека. Однако результаты этих исследований до сих пор остаются весьма противоречивыми. Поскольку интерпретация медицинских данных затруднена в связи с сопутствующими заболеваниями родителей, различиями в применяемых протоколах и другими сложно поддающимися учету факторами, все это создает мотивацию для постановки экспериментов на лабораторных животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-

00162), а также бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (проект № 0259-2019-0003-С-01).

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

С.В. Раннева и Е.Ю. Брусенцев ответственны за подготовку раздела “Оптимизация культуральных систем”, а также подготовку таблиц; Д.С. Рагаева и Н.И. Ершов ответственны за подготовку раздела “Особенности развития преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro* и влияние на последующий онтогенез”; Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова и А.Л. Левинсон ответственны за подготовку раздела “Отдаленные последствия врт на постнатальное развитие потомков млекопитающих”; С.Я. Амстиславский участвовал в написании всех разделов и осуществлял общую редакцию статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 372–377.
- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 73–88.
- Кожевникова В.В., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю. и др. Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 7. С. 810–815.
- Adamson G.D., de Mouzon J., Chambers G.M. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011 // Fertility and Sterility. 2018. V. 110. № 6. P. 1067–1080.
- Aghaz F., Hajarian H., Karami Shabankareh H. *In vitro* culture medium (IVC) supplementation with sericin improves developmental competence of ovine zygotes // Reprod. Biol. 2016. V. 16. № 1. P. 87–90.
- Aguilar J., Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects // Anim. Reprod. 2005. V. 2. № 2. P. 91–105.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) // Reprod. Dom. Anim. 2018. V. 53. № 5. P. 1219–1226.

- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) // *Theriogenology*. 2015. V. 83. № 6. P. 1056–1063.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // *Reprod. Domest. Anim.* 2012. V. 47. № 1. P. 164–175.
- Aviles M., Gutierrez-Adan A., Coy P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? // *Molecular Human Reproduction*. 2010. V. 16. № 12. P. 896–906.
- Banrezes B., Sainte-Beuve T., Canon E. et al. Adult body weight is programmed by a redox-regulated and energy-dependent process during the pronuclear stage in mouse // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. e29388.
- Barbuscia A., Mills M.C. Cognitive development in children up to age 11 years born after ART—a longitudinal cohort study // *Hum. Reprod.* 2017. V. 24. P. 1–7.
- Barker D.J. The origins of the developmental origins theory // *J. Intern. Med.* 2007. V. 261. № 5. P. 412–417.
- Belli M., Zhang L., Liu X. et al. Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in *in vitro* fertilized preimplantation mouse embryos // *Hum. Reprod.* 2019. V. 34. № 4. P. 601–611.
- Belva F., Henriot S., Liebaers I. et al. Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born > or = 32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 2. P. 506–515.
- Berntsen S., Soderstrom-Anttila V., Wennerholm U.B. et al. The health of children conceived by ART: “the chicken or the egg?” // *Hum. Reprod. Update*. 2019. V. 25. № 2. P. 137–158.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Lawitts J.A. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 12. P. 3376–3384.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Lawitts J.A. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online*. 2004. V. 9. № 1. P. 59–69.
- Biggers J.D., McGinnis L.K. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development *in vitro* // *Hum. Reprod.* 2001. V. 16. № 1. P. 153–163.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63. № 1. P. 281–293.
- Bloise E., Feuer S.K., Rinaudo P.F. Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 822–839.
- Bloise E., Lin W., Liu X. et al. Impaired placental nutrient transport in mice generated by *in vitro* fertilization // *Endocrinology*. 2012. V. 153. P. 3457–3467.
- Bowman P., McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24. № 1. P. 203–207.
- Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos // *Int. J. Dev. Biol.* 2019. V. 63. P. 93–103.
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V. et al. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // *Theriogenology*. 2018. V. 110. P. 148–152.
- Brusentsev E. Yu., Igonina T.N., Abramova T.O. et al. Cryopreservation, *in vitro* culture and transfer of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. V. 50. P. 677–683.
- Canovas S., Ivanova E., Romar R. et al. DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids // *Elife*. 2017. V. 6. P. 1–24.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Vermeiden J.P.W. et al. Cardiometabolic differences in children born after *in vitro* fertilization: follow-up study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. № 5. P. 1682–1688.
- Chatot C.L., Lewis J.L., Torres I., Ziomek C.A. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium // *Biol. Reprod.* 1990. V. 42. № 3. P. 432–440.
- Chen M., Wu L., Zhao J. et al. Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF // *Diabetes*. 2014. V. 63. № 10. P. 3189–3198.
- Choi Y.H., Love C.C., Varner D.D., Love L.B., Hinrichs K. Effects of gas conditions, time of medium change, and ratio of medium to embryo on *in vitro* development of horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection // *Theriogenology*. 2003a. V. 59. № 5–6. P. 1219–1229.
- Choi Y.H., Chung Y.G., Walker S.C., Westhusin M.E., Hinrichs K. *In vitro* development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture // *Zygote*. 2003b. V. 11. № 1. P. 77–86.
- Cozzi J., Wang E., Jacquet C. et al. Procedures for somatic cell nuclear transfer in the rat // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 597. P. 137–150.
- D'Angelo D.V., Whitehead N., Helms K., Barfield W., Ahluwalia I.B. Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment // *Fertil. Steril.* 2011. V. 96. № 2. P. 314–320.
- de Waal E., Mak W., Calhoun S. et al. *In vitro* culture increases the frequency of stochastic epigenetic errors at imprinted genes in placental tissues from mouse concept produced through assisted reproductive technologies // *Biol. Reprod.* 2014. V. 90. № 2. P. 22.
- Delle Piane L., Lin W., Liu X. et al. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. P. 2039–2046.
- Dieamant F., Petersen C.G., Mauri A.L. et al. Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis // *JBRA Assist. Reprod.* 2017. V. 21. № 3. P. 240–246.
- Dinopoulou V., Drakakis P., Kefala S. et al. Effect of recombinant-LH and hCG in the absence of FSH on *in vitro* maturation (IVM) fertilization and early embryonic development of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes // *Reprod. Biol.* 2016. V. 16. № 2. P. 138–146.

- Donjacour A., Liu X., Lin W., Simbulan R., Rinaudo P.F. *In vitro* fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model // *Biol. Reprod.* 2014. V. 90. № 4. P. 80.
- Dumoulin J.C., Land J.A., Van Montfoort A.P., et al. Effect of *in vitro* culture of human embryos on birthweight of newborns // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. № 3. P. 605–612.
- Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? // *Mol. Reprod. Dev.* 2018. V. 85. № 4. P. 348–368.
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z. et al. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 6. 1595–1600.
- El Hajj N., Haaf T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. № 3. P. 632–641.
- Fauque P., Mondon F., Letourneur F. et al. *In vitro* fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model // *PLoS One.* 2010. V. 5. e9218.
- Fernandez-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A. et al. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 16. P. 5880–5885.
- Feuer S., Liu X., Donjacour A., et al. Common and specific transcriptional signatures in mouse embryos and adult tissues induced by *in vitro* procedures // *Reproduction.* 2016. pii: REP-16-0473.
- Feuer S.K., Liu X., Donjacour A. et al. Use of a mouse *in vitro* fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis // *Endocrinology.* 2014. V. 155. № 5. P. 1956–1969.
- Finger B.J., Harvey A.J., Green M.P., Gardner D.K. Combined parental obesity negatively impacts preimplantation mouse embryo development, kinetics, morphology and metabolism // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 9. P. 2084–2096.
- Fischer B., Bavister B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits // *Reproduction.* 1993. V. 99. № 2. P. 673–679.
- Fleming T.P., Watkins A.J., Velazquez M.A. et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences // *Lancet.* 2018. V. 391. № 10132. P. 1842–1852.
- Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J. Embryos, DOHaD and David Barker // *J. Dev. Orig. Health. Dis.* 2015. V. 6. № 5. P. 377–383.
- Gardner D.K., Lane M. Mammalian preimplantation embryo culture // *Methods. Mol. Biol.* 2014. V. 1092. P. 167–182.
- Gardner D.K., Lane M., Watson A.J. A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo. Oxford University Press, 2004. 393 p.
- Gardner D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture // *Theriogenology.* 1998. V. 49. № 1. P. 83–102.
- Guo X.Y., Liu X.M., Jin L. et al. Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107. № 3. P. 622–631.
- Haavaldsen C., Tanbo T., Eskild A. Placental weight in singleton pregnancies with and without assisted reproductive technology: a population study of 536, 567 pregnancies // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. P. 576–582.
- Halliday J., Lewis S., Kennedy J. et al. Health of adults aged 22 to 35 years conceived by assisted reproductive technology // *Fertil. Steril.* 2019. V. 112. № 1. P. 130–139.
- Han M.S., Niwa K. Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos // *J. Reprod. Dev.* 2003. V. 49. № 3. P. 235–242.
- Hattori H., Hiura H., Kitamura A. et al. Association of four imprinting disorders and ART // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11. № 1. P. 21.
- Hayashi M., Nakai A., Satoh S., Matsuda Y. Adverse obstetric and perinatal outcomes of singleton pregnancies may be related to maternal factors associated with infertility rather than the type of assisted reproductive technology procedure used // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 4. P. 922–928.
- Herrick J.R., Bond J.B., Magarey G.M. et al. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of *in vitro* fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown *in vivo* // *Biol. Reprod.* 2007. V. 76. № 5. P. 858–870.
- Higdon H.L. 3rd, Blackhurst D.W., Boone W.R. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory // *Techniques and Instrumentation.* 2008. V. 89. № 3. P. 703–710.
- Hiura H., Okae H., Chiba H. et al. Imprinting methylation errors in ART // *Reprod. Med. Biol.* 2014. V. 13. № 4. P. 193–202.
- Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S. et al. Contrasting effects of G1.2/G2.2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre- and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos // *Reprod. Biomed. Online.* 2015. V. 31. № 3. P. 372–383.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M. et al. Effects of *in vitro* culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy.* 2019. V. 38. № 4. P. 208–216.
- Izquierdo D., Villamediana P., Paramio M.T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes // *Theriogenology.* 1999. V. 52. № 5. P. 847–861.
- Jaques A.M., Amor D.J., Baker H.W. et al. Adverse obstetric and perinatal outcomes in subfertile women conceiving without assisted reproductive technologies // *Fertil. Steril.* 2010. V. 94. № 7. P. 2674–2679.
- Joy J., Gannon C., McClure N., Cooke I. Is assisted reproduction associated with abnormal placentation? // *Pediatr. Dev. Pathol.* 2012. V. 15. P. 306–314.
- Kahveci B., Melekoglu R., Evruke I.C., Cetin C. The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies // *BMC Preg. Child.* 2018. V. 18. № 1. P. 343.
- Kallen A.J., Finnstrom O.O., Lindam A.P. et al. Cerebral palsy in children born after *in vitro* fertilization. Is the risk decreasing? // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2010. V. 14. № 6. P. 526–530.

- Kasterstein E., Strassburger D., Komarovskiy D. et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study // *J. Assisted Reproduction and Genetics*. 2013. V. 30. № 8. P. 1073–1079.
- Kawamura K., Chen Y., Shu Y. et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. e49328.
- Kettner L.O., Matthiesen N.B., Ramlau-Hansen C.H. et al. Fertility treatment and childhood type 1 diabetes mellitus: a nationwide cohort study of 565,116 live births // *Fertil. Steril.* 2016. V. 106. № 7. P. 1751–1756.
- Kissin D.M., Zhang Y., Boulet S.L. et al. Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 2. P. 454–465.
- Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. Health of children born after ovulation induction // *Fertil. Steril.* 2010. V. 93. № 4. P. 1157–1168.
- Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. Health of children born as a result of *in vitro* fertilization // *Pediatrics*. 2006. V. 118. № 5. P. 1819–1827.
- Kleijkers S.H., Eijssen L.M., Coonen E. et al. Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 10. P. 2303–2311.
- Labarta E., Bosch E., Pellicer A. Impact of ovarian stimulation with gonadotrophins on embryo aneuploidy // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 964.
- Lane M., Gardner D.K., Hasler M.J., Hasler J.F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture // *Theriogenology*. 2003. V. 60. № 3. P. 407–419.
- Lawitts J.A., Biggers J.D. Culture of Preimplantation Embryos // *Methods. Enzymol.* 1993. V. 225. P. 153–164.
- Lawitts J.A., Biggers J.D. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium // *Biol. Reprod.* 1991. V. 45. № 2. P. 245–251.
- Lazaraviciute G., Kauser M., Bhattacharya S., Haggarty P., Bhattacharya S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 840–852.
- Le Saint C., Crespo K., Bourdieu A. et al. Autologous endometrial cell co-culture improves human embryo development to high-quality blastocysts: a randomized controlled trial // *Reproductive Biomedicine Online*. 2019. V. 38. № 3. P. 321–329.
- Leese H.J. The formation and function of oviduct fluid // *J. Reprod. Fertil.* 1988. V. 82. P. 843–856.
- Lehti V., Brown A.S., Gissler M. et al. Autism spectrum disorders in IVF children: a national case-control study in Finland // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 3. P. 812–818.
- Leunens L., Celestin-Westreich S., Bonduelle M., Liebaers I., Ponjaert-Kristoffersen I. Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 105–111.
- Leunens L., Celestin-Westreich S., Bonduelle M., Liebaers I., Ponjaert-Kristoffersen I. Cognitive and motor development of 8-year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 11. P. 2922–2929.
- Li L., Le F., Wang L.Y. et al. Normal epigenetic inheritance in mice conceived by *in vitro* fertilization and embryo transfer // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B*. 2011. V. 12. № 10. P. 796–804.
- Li Z.Y., Jiang Q.S., Zhang Y.L., Liu X.M., Engelhardt J.F. Successful production of offspring after superovulation and *in vitro* culture of embryos from domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) // *Reproduction*. 2001. V. 122. № 4. P. 611–618.
- Lindeberg H., Jalkanen L., Savolainen R. *In vitro* culture of silver fox embryos // *Theriogenology*. 1993. V. 40. № 4. P. 779–788.
- Liu L., Gao J., He X. et al. Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 46207.
- Liu H., Zhang Y., Gu H. et al. Association between assisted reproductive technology and cardiac alteration at age 5 years // *JAMA Pediatr.* 2015. V. 169. № 6. P. 603–605.
- Liu Z., Foote R.H., Simkin M.E. Effect of amino acids and alpha-amanitin on the development of rabbit embryos in modified protein-free KSOM with HEPES // *Mol. Reprod. Dev.* 1996. V. 45. № 2. P. 157–162.
- Ludwig A.K., Katalinic A., Thyen U. et al. Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective, controlled, single-blinded study // *Fertil. Steril.* 2009a. V. 91. № 1. P. 115–124.
- Ludwig A., Katalinic A., Thyen U. et al. Neuromotor development and mental health at 5.5 years of age of singletons born at term after intracytoplasmic sperm injection ICSI: results of a prospective controlled single-blinded study in Germany // *Fertil. Steril.* 2009b. V. 91. № 1. P. 125–132.
- Ludwig A.K., Katalinic A., Jendryzik J. et al. Spontaneous pregnancy after successful ICSI treatment: evaluation of risk factors in 899 families in Germany // *Reprod. Biomed. Online*. 2008. V. 17. № 3. P. 403–409.
- Luvoni G.C., Chigioni S., Beccaglia M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning // *Reprod. Domest. Anim.* 2006. V. 41. № 4. P. 286–290.
- Machaty Z., Day B.N., Prather R.S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo* // *Biol. Reprod.* 1998. V. 59. № 2. P. 451–455.
- Maimburg R.D., Vaeth M. Do children born after assisted conception have less risk of developing infantile autism? // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 7. P. 1841–1843.
- Makieva S., Giacomini E., Ottolina J. et al. Inside the endometrial cell signaling subway: Mind the gap (s) // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. V. 19. № 9. P. 2477.
- Mani S., Ghosh J., Coutifaris C. et al. Epigenetic changes and assisted reproductive technologies // *Epigenetics*. 2020. V. 15. № 1–2. P. 12–25.
- Mani S., Mainigi M. Embryo culture conditions and the epigenome // *Semin. Reprod. Med.* 2018. V. 36. P. 211–220.

- Mantikou E., Jonker M.J., Wong K.M. et al. Factors affecting the gene expression of *in vitro* cultured human preimplantation embryos // Hum. Reprod. 2016. V. 31. № 2. P. 298–311.
- Mara L., Sanna D., Casu S., Dattena M., Munoz I.M. Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season // Zygote. 2014. V. 22. № 3. P. 366–371.
- Market-Velker B.A., Fernandes A.D., Mann M.R. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal *in vitro* culture interferes with imprint maintenance // Biol. Reprod. 2010. V. 83. № 6. P. 938–950.
- Marshall K.L., Rivera R.M. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo // Mol. Reprod. Dev. 2018. V. 85. № 2. P. 90–105.
- Meister T.A., Rimoldi S.F., Soria R. et al. Association of assisted reproductive technologies with arterial hypertension during adolescence // J. Am. Col. Card. 2018. V. 72. № 11. P. 1267–1274.
- Men H., Stone B.J., Bryda E.C. Media optimization to promote rat embryonic development to the blastocyst stage *in vitro* // Theriogenology. 2020. V. 151. P. 81–85.
- Menezo Y., Lichtblau I., Elder K. New insights into human pre-implantation metabolism *in vivo* and *in vitro* // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2013. V. 30. № 3. P. 293–303.
- Miles J.R., Farin C.E., Rodriguez K.F., Alexander J.E., Farin P.W. Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation // Biol. Reprod. 2005. V. 73. P. 663–671.
- Miller K. Optimizing culture conditions. Chapter 17. Published by Cambridge university press. Culture media, solutions, and systems in human ART. ed. Patrick Quinn. Cambridge University Press, 2014.
- Miyoshi K., Abeydeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos // J. Reprod. Fertil. 1995. V. 103. № 1. P. 27–32.
- Miyoshi K., Funahashi H., Okuda K. et al. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity // J. Reprod. Fertil. 1994. V. 100. P. 21–26.
- Morbeck D.E., Baumann N.A., Oglesbee D. Composition of single-step media used for human embryo culture // Fertil. Steril. 2017. V. 107. № 4. P. 1055–1060. e1.
- Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al. Composition of commercial media used for human embryo culture // Fertil. Steril. 2014. V. 102. № 3. P. 759–766. e9.
- Mussa A., Molinatto C., Cerrato F. et al. Assisted reproductive techniques and risk of Beckwith-Wiedemann syndrome // Pediatrics. 2017. V. 140. № 1. pii: e20164311.
- Nakamura K., Morimoto K., Shima K. et al. The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development // Theriogenology. 2016. V. 86. № 8. P. 2083–2090.
- Nedambale T.L., Dinnyes A., Groen W. et al. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification // Theriogenology. 2004. V. 62. № 3–4. P. 437–449.
- Nelissen E.C., Dumoulin J.C., Daunay A. et al. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions // Hum. Reprod. 2013. V. 28. P. 1117–1126.
- Pandey S., Shetty A., Hamilton M., Bhattacharya S., Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis // Hum. Reprod. Update. 2012. V. 18. № 5. P. 485–503.
- Pinborg A., Wennerholm U.B., Romundstad L.B. et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis // Hum. Reprod. Update. 2013. V. 19. № 2. P. 87–104.
- Pinborg A., Loft A., Schmidt L., Andersen A.N. Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families // Hum. Reprod. 2003. V. 18. № 6. P. 1234–1243.
- Pinheiro R.L., Areia A.L., Mota Pinto A., Donato H. Advanced maternal age: adverse outcomes of pregnancy, a meta-analysis // Acta. Med. Port. 2019. V. 32. № 3. P. 219–226.
- Place I., Englert Y. A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children conceived spontaneously and by *in vitro* fertilization // Fertil. Steril. 2003. V. 80. № 6. P. 1388–1397.
- Pollard J.W., Plante C., Leibo S.P. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media // J. Reprod. Fertil. 1995. V. 103. № 2. P. 331–337.
- Ponjaert-Kristoffersen I., Bonduelle M., Barnes J. et al. International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, *in vitro* fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments // Pediatrics. 2005. V. 115. № 3. e283–289.
- Ponjaert-Kristoffersen I., Tjus T., Nekkebroeck J. et al. Psychological follow-up study of 5-year-old ICSI children // Hum. Reprod. 2004. V. 19. № 12. P. 2791–2797.
- Ramos-Ibeas P., Heras S., Gomez-Redondo I. et al. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies // Mol. Reprod. Dev. 2019. V. 86. № 10. P. 1292–1306.
- Raunig J.M., Yamauchi Y., Ward M.A., Collier A.C. Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction // Placenta. 2011. V. 32. P. 852–858.
- Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development // Science. 2001. V. 293. № 5532. P. 1089–1093.
- Rexhaj E., Paoloni-Giacobino A., Rimoldi S.F. et al. Mice generated by *in vitro* fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. № 12. P. 5052–5060.
- Rivera R.M., Stein P., Weaver J.R. et al. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant

- expression of imprinted genes on day 9.5 of development // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 1. P. 1–14.
- Rodrigues B.A., dos Santos L.C., Rodrigues J.L. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* 2004. V. 67. № 2. P. 215–223.
- Rumbold A.R., Moore V.M., Whitrow M.J. et al. The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: A systematic review // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32. P. 1489–1507.
- Sagirkaya H., Misirlioglu M., Kaya A. et al. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos // *Reproduction.* 2006. V. 131. № 5. P. 895–904.
- Salilew-Wondim D., Fournier E., Hoelker M. et al. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed *in vivo* from embryos completed different stages of development *in vitro* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 11. e0140467.
- Sananmuang T., Tharasanit T., Nguyen C., Phutikanit N., Techakumphu M. Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos // *Theriogenology.* 2011. V. 75. № 9. P. 1708–1719.
- Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A., et al. Autism and mental retardation among offspring born after *in vitro* fertilization // *JAMA.* 2013. V. 310. P. 75–84.
- Santi D., De Vincentis S., Magnani E., Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study // *Andrology.* 2017. V. 5. № 4. P. 695–703.
- Sato A., Otsu E., Negishi H., Utsunomiya T., Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 1. P. 26–35.
- Scherrer U., Rimoldi S.F., Rexhaj E. et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies // *Circulation.* 2012. V. 125. № 15. P. 1890–1896.
- Schini S.A., Bavister B.D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 5. P. 1183–1192.
- Schwarzer C., Esteves T.C., Arauzo-Bravo M.J. et al. ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 9. P. 2627–2640.
- Scott K.A., Yamazaki Y., Yamamoto M. et al. Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 2. P. 220–227.
- Seshagiri P.B., Vani V. Enabling hamster embryo culture system: development of preimplantation embryos // *Methods. Mol. Biol.* 2019. V. 2006. P. 45–61.
- Song S., Ghosh J., Mainigi M. et al. DNA methylation differences between *in vitro*- and *in vivo*-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility // *Clin. Epigenetics.* 2015. V. 7. P. 41.
- Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Lancet.* 1978. V. 312. P. 366.
- Swain J.E., Carrell D., Cobo A. et al. Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential // *Fertil. Steril.* 2016. V. 105. № 3. P. 571–587.
- Swain J.E., Bormann C.L., Krisher R.L. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium // *Theriogenology.* 2001. V. 56. № 3. P. 459–469.
- Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y. et al. Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. 1–12.
- Summers M.C. A brief history of the development of the KSOM family of media // *Hum. Fertil.* 2014. V. 17. Suppl. 1. P. 12–16.
- Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues // *Hum. Reprod. Update.* 2003. V. 9. № 6. P. 557–582.
- Sunde A. Embryo culture and phenotype of the offspring // *In Vitro Fertilization.* 2019. P. 877–889.
- Sunkara S.K., Chinta P., Kamath M.S. Perinatal outcomes following assisted reproductive technology // *J. Hum. Reprod. Sci.* 2019. V. 12. P. 177–181.
- Tan K., Zhang Z., Miao K., et al. Dynamic integrated analysis of DNA methylation and gene expression profiles in *in vivo* and *in vitro* fertilized mouse post-implantation extraembryonic and placental tissues // *Mol. Hum. Reprod.* 2016. V. 22. № 7. P. 485.
- Tarahomi M., Vaz F.M., van Straalen J.P. et al. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture // *Hum. Reprod.* 2019. V. 34. № 8. P. 1450–1461.
- Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 30. № 3. P. 493–497.
- Trasorras V., Baca Castex C., Alonso A. et al. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals // *Anim. Reprod. Sci.* 2014. V. 148. № 1–2. P. 83–89.
- Valenzuela-Alcaraz B., Serafini A., Sepulveda-Martinez A. et al. Postnatal persistence of fetal cardiovascular remodeling associated with assisted reproductive technologies: a cohort study // *BJOG.* 2019. V. 126. № 2. P. 291–298.
- Valenzuela-Alcaraz B., Crispi F., Bijmens B. et al. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally // *Circulation.* 2013. V. 128. № 13. P. 1442–1450.
- Vlachopoulos C., Kosteria I., Sakka S. et al. PCSK9 and Lp(a) levels of children born after assisted reproduction technologies // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 6. P. 1091–1099.
- Von Arx R., Allemann Y., Sartori C. et al. Right ventricular dysfunction in children and adolescents conceived by assisted reproductive technologies // *J. App. Phys.* 2015. V. 118. № 10. P. 1200–1206.
- Wagenaar K., Ceelen M., van Weissenbruch M.M. et al. School functioning in 8- to 18-year-old children born after *in vitro* fertilization // *Eur. J. Pediatr.* 2008. V. 167. № 11. P. 1289–1295.
- Wang Q., Zhang Y., Le F. et al. Alteration in the expression of the renin-angiotensin system in the myocardium of mice conceived by *in vitro* fertilization // *Biol. Reprod.* 2018. V. 99. № 6. P. 1276–1288.
- Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T. et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype includ-

- ing raised systolic blood pressure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 13. P. 5449–5454.
- Wennerholm U.B., Bergh C. Perinatal outcome in children born after assisted reproductive technologies // Ups. J. Med. Sci. 2020. P. 1–9.
- Xie Y., Wang F., Puscheck E.E., Rappolee D.A. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos // Mol. Reprod. Dev. 2007. V. 74. № 10. P. 1287–1294.
- Yaqoob S.H., Saadeldin I.M., Swelum A.A.-A., Alowaimer A.N. Optimizing camel (*Camelus dromedarius*) oocytes in vitro maturation and early embryo culture after parthenogenetic activation // Smal. Rum. Res. 2017. V. 153. P. 81–86.
- Youssef M.M., Mantikou E., van Wely M., et al. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles // Cochrane Database Syst. Rev. 2015. № 11. CD007876.
- Zacchini F., Sampino S., Stankiewicz A.M., Haaf T., Ptak G.E. Assessing the epigenetic risks of assisted reproductive technologies: a way forward // Int. J. Dev. Biol. 2019. V. 63. P. 217–222.
- Zandstra H., Van Montfoort A.P., Dumoulin J.C. Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? // Hum. Reprod. 2015. V. 30. № 3. P. 530–542.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G. David, Dyer S. et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017 // Human Reproduction. 2017. V. 32. № 9. P. 1786–1801.
- Zhou J., Liu H., Gu H.T. et al. Association of cardiac development with assisted reproductive technology in childhood: a prospective single-blind pilot study // Cell. Physiol. Biochem. 2014. V. 34. № 3. P. 988–1000.
- Zhou Q., Yang S.H., Ding C.H. et al. A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey // Hum. Reprod. 2006. V. 21. № 10. P. 2564–2571.
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B. et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization // Fertil. Steril. 2013. V. 99. P. 1600–1609.

***In Vitro* Culture of Preimplantation Embryos and Its Influence on Mammalian Ontogenesis**

S. V. Ranneva^{1,2}, E. Yu. Brusentsev¹, T. N. Igonina¹, D. S. Ragaeva¹, I. N. Rozhkova¹, N. I. Ershov¹, A. L. Levinson³, and S. Ya. Amstislavsky^{1,2,*}

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

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

³*Novosibirsk Center of Reproductive Medicine, ul. Heroes of the Revolution 3, Novosibirsk, 630037 Russia*

*e-mail: amstis@yandex.ru

Effects of assisted reproductive technologies, *in vitro* culture in particular, on the pre- and postnatal development of mammals are reviewed. The influence of the culture medium on the development of preimplantation embryo and the fetus are considered. A special emphasis is made on the long-term effects of these procedures on the offspring.

Keywords: assisted reproductive technologies, *in vitro* culture, preimplantation embryo, fetus, ontogenesis, epigenetics, long-term effects

РАННЕЕ ПОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ СТАРЕНИЯ В РЕТИНАЛЬНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ У МОЛОДЫХ КРЫС АЛЬБИНОСОВ

© 2020 г. Ю. П. Новикова^а, *, Э. Н. Григорян^а, **

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

*e-mail: info@idbras.ru

**e-mail: leonore@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2020 г.

После доработки 26.04.2020 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), чьи основные функции заключаются в прямом участии в световосприятии и обеспечении трофики и функционирования сетчатки глаза, традиционно является предметом многочисленных исследований. Значительная их часть носит биомедицинский характер и направлена на выявление причин старения и дегенерации РПЭ, в свою очередь, ассоциированных с рядом серьезных, приводящих к потере зрения, заболеваний сетчатки. Часто объектом таких исследований служат грызуны, в частности, крыса альбинос (Вистар). Наша работа направлена на выявление признаков старения в РПЭ у молодых (от 2 нед. до 2 мес.) крыс альбиносов. С помощью методов флуоресцентного анализа и окрашивания по методу Шморля, в уже раннем возрасте крыс альбиносов в изолированном слое РПЭ выявлено накопление “пигмента старения” липофусцина, а также высокое содержание полиплоидных двуядерных клеток по отношению к одноядерным клеткам. Параллельно обнаружено наличие липофусцина в подстилающей РПЭ, изолированной сосудистой оболочке (хороиде) сетчатки. Обсуждается взаимосвязь между выявленным в работе ранним появлением признаков старения в РПЭ крыс альбиносов и отсутствием в клетках этой ткани пигмента меланина. Полученные данные рекомендуется учитывать при проведении экспериментальных офтальмологических исследований на этом животном модельном объекте.

Ключевые слова: крыса альбинос, глаз, развитие, ретинальный пигментный эпителий, липофусцин, меланин, многоядерность

DOI: 10.31857/S0475145020060063

ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) является монослоем поляризованных и высокоспециализированных пигментированных клеток. РПЭ расположен между нейральной сетчаткой и ее васкулярным слоем, именуемым хороидом, снабжающим сетчатку всеми необходимыми для ее нормальной трофики веществами и кислородом. РПЭ, помимо переноса веществ по базально-апикальному градиенту клеток, выполняет ряд важных функций, необходимых для поддержания гомеостаза и нормального функционирования сетчатки. Хорошо известно, что основной функцией РПЭ является фагоцитоз слущивающихся наружных сегментов фоторецепторов сетчатки, а затем их переваривание с помощью лизосом (Strauss, 2005). Это позволяет фоторецепторам синтезировать новые отростки для световосприятия, обеспечивает жизнеспособность клеток и метаболизм ретиноидов (Young et al., 1971; Mazzoni et al., 2014). Однако осуществить полное переваривание фоторецепторных наружных отростков с

помощью лизосомальных ферментов и их полную деградацию клеткам РПЭ не удается, что в результате постепенно и неуклонно с возрастом приводит к аккумуляции липофусцина (ЛФ) (Katz, 1989; Gu et al., 2012). Наружные сегменты фоторецепторных клеток богаты полиненасыщенными жирными кислотами, подверженными воздействию свободных радикалов, в больших количествах находящихся в клетках функционирующей в условиях постоянного облучения светом сетчатки глаза. Полиненасыщенные жирные кислоты в результате переокисления, катализируемого в лизосомах ионами металлов, трансформируются во флуорофору – обладающие аутофлуоресценцией компоненты ЛФ (Gutteridge et al., 1982; Smith et al., 2016). Предполагается также, что ЛФ в РПЭ представляет собой гетерогенный материал, в состав которого входят также жиры и белки, а флуоресцирующие компоненты различны и основной среди них идентифицирован как дериват витамина А (Kennedy et al., 1995).

В то же время известно, что клетки РПЭ взрослых животных *in vivo*, если и обладают пролиферативной активностью, то только на очень низком уровне, на периферии слоя (Al-Hussaini et al., 2008; Григорян, 2014). По этой причине весь аккумулируемый ЛФ остается в цитоплазме, и количество его в клетках РПЭ не только не снижается, но, напротив, возрастает. Этот процесс поддается экспериментальному воссозданию при культивировании РПЭ *in vitro* в условиях оксидативного стресса (Sundelin et al., 2001). Последствиями накопления ЛФ являются дегенерация клеток РПЭ и нарушение функции фоторецепторных отростков. С дегенерацией и дисфункцией РПЭ связаны многие заболевания сетчатки глаза человека. К их числу относится и макулярная дистрофия сетчатки (age-related macular degeneration, AMD), часто приводящая к слепоте (Sparrow et al., 2010).

К связанным с возрастом процессам в РПЭ имеет отношение и возрастание относительного числа многоядерных клеток на фоне снижения общей численности клеток в популяции. Наличие в слое РПЭ одноядерных и полиплоидных, в основном двуядерных клеток является обычным явлением для грызунов (Al-Hussaini et al., 2008). У старых мышей, например, доля многоядерных клеток РПЭ может достигать 80%, и подавляющее их число составляют двуядерные клетки (Chen et al., 2016). Данные Чен и соавторов свидетельствуют также о том, что клетки, становясь двуядерными, значительно увеличиваются в размерах, хотя и сохраняют при этом свою фагоцитарную активность в отношении слушающихся дисков наружных сегментов фоторецепторов сетчатки. Предполагается, что важную роль в обретении слоем РПЭ многоядерных клеток играет возрастающая, связанная с ростом глаза фагоцитарная нагрузка, нарушающая цитокинез клеток, а многоядерность клеток является неким защитным механизмом для сохранения слоя РПЭ и его основной функции (Chen et al., 2016).

Известно, что развитие дегенеративных процессов в РПЭ часто сопровождается потерей клетками пигмента – меланиновых гранул (см. обзор Rozanowska, 2011). Меланин является полимером высокого молекулярного веса, синтезируется и накапливается в РПЭ в процессе развития и роста глаза. Меланин образуется в результате окисления молекул предшественников – тирозина и дигидроксифенилаланина (ДОФА) и содержится в гранулах, заполняющих цитоплазму клеток РПЭ (Rozanowska, 2011). Важной функцией меланина, находящегося в высокой концентрации в апикальной цитоплазме и апикальных отростках клеток РПЭ, является защита фоторецепторов от избыточного света. Предполагается, что фотозащитная роль меланина в клетках РПЭ обусловлена его способностью связывать редокс-активные ионы металлов (Sarna, 1992). В количественной конкуренции с меланином находится

ЛФ – чем больше меланина в клетках РПЭ, тем меньше гранул ЛФ и наоборот (Sundelin et al., 2001).

Альбинизм характеризуется разрушением меланосом, где пигмент синтезируется и откладывается, и/или нарушением процесса синтеза меланина (см. обзор Grønskov et al., 2007; Summers, 2009). Однако РПЭ и нейральная сетчатка грызунов альбиносов используются *in vivo* (Новикова и др., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014; Iwai et al., 2016) и *in vitro* (Cortese et al., 2005; Grigoryan et al., 2012) в качестве модели для изучения развития сетчатки глаза и зависимых от возраста процессов, способных вести к дегенерации сетчатки. Для проведения такого рода исследований нужны дополнительные характеристики РПЭ грызунов альбиносов, в частности в отношении наличия и накопления ЛФ, а также развития многоядерности клеток в слое РПЭ, как еще одного зависимо от возраста процесса. В данной работе мы использовали препараты слоя (whole amount) РПЭ крыс альбиносов для изучения этих признаков в возрастном диапазоне от двух недель до двух месяцев после рождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Работа была проведена на РПЭ молодых крыс альбиносов Wistar в возрасте 2 нед., 1 мес. и 2 мес. после рождения. Выбор возраста крыс обусловлен нашим предварительным наблюдением, свидетельствующим о том, что уже спустя 1 мес. после рождения отдельные клетки РПЭ этих животных могут содержать заметное число гранул, обладающих аутофлуоресценцией. В условиях вивария все крысы находились при световом режиме 12 ч свет/темнота и свободном доступе к еде и воде.

Выделение ретинального пигментного эпителия

После анестезии глаза крыс альбиносов в возрасте 2 нед., 1 мес. и 2 мес. были энуклеированы. Для исследования слоя РПЭ использовали (с модификациями) метод его выделения whole amount с применением диссоциирующих сред (Wang et al., 1993).

Сразу после выделения глаза помещали в охлажденную среду DMEM и переносили в условия бокса. В среде DMEM глаза освобождали от мышц и соединительной ткани, дважды отмывали в холодном растворе Хенкса без кальция (HBSS, Gibco), содержащем ЭДТА (Хеликон) в концентрации 10 ммол/л, pH 7.4. Далее с помощью бинокуляра глаза разделяли на передний и задний секторы, микрохирургически, делая разрез постериорнее за пределами лимба (рис. 1). Нейральная сетчатка при этом оставалась в составе задней стенки глаза. Затем задние секторы глазных чаш были вновь отмыты три раза в холодном растворе Хенкса с ЭДТА.

Затем задние секторы глаз крыс были инкубированы при 37°C в течение 10–12 мин в растворе Хенкса с ЭДТА, куда были добавлены гиалуронидаза IV типа (220 ед./мл, Merck) и коллагеназа I типа (65 ед./мл, производитель ПанЭко). Потом глазные чаши вновь переносили в холодный раствор Хенкса с ЭДТА, где проводили выделение нейральной сетчатки, РПЭ при этом оставался неповрежденным в составе заднего сектора глаза. Задние секторы глаз вновь инкубировали в растворе указанных выше диссоциирующих сред в течение 8 мин при 37°C и переносили в холодный раствор Хенкса с ЭДТА, в котором дважды отмывали от ферментов коллагеназы и гиалуронидазы.

После инкубации в растворе Хенкса с ЭДТА при комнатной температуре (30 мин) для достижения полной отслойки слоя РПЭ от подлежащих тканей, его аккуратно отделяли тонкими стеклянными палочками с запаянным концом (0,3–0,5 мм) по краю, двигаясь в сторону центра глаза, к области выхода зрительного нерва. После отделения РПЭ его забирали пипеткой и осторожно переносили на предметные стекла, которые помещали в широкую чашку Петри в пары формалина для мягкой фиксации ткани РПЭ. Параллельно у крыс двухмесячного возраста удавалось выделить фрагменты подстилающей РПЭ сосудистой оболочки, которые были фиксированы тем же способом.

Фиксированные препараты РПЭ крыс альбиносов разного возраста использовали для дальнейшей гистологической обработки с окрашиванием гематоксилин – эозином, окраски по методу Шморля, а также (минуя гистологическую обработку) для анализа аутофлуоресценции гранул ЛФ на тотальных препаратах РПЭ с помощью флуоресцентного микроскопа. Для окрашивания по методу Шморля применяли дополнительно поперечные парафиновые срезы (7 мкм) задней стенки глаз крыс разного возраста, фиксированной в 4%-ом формалине.

Окрашивание по методу Шморля

После депарафинирования срезы, взятые из экваториальных и центральных областей задней стенки глаза, а также фиксированные фрагменты пластов РПЭ крыс разного возраста трижды промывали в дистиллированной воде. Затем их помещали в свежеприготовленную среду для окрашивания, содержащую 1%-ый хлорид железа (30 мл), гексацианоферрат калия (4 мл) и дистиллированную воду (6 мл). Контроль интенсивности окрашивания проводили с помощью микроскопа в интервале от 5 до 10 мин реакции с красителем. После этого препараты тщательно промывали в проточной воде, обезвоживали, помещали в ксилол, затем заключали в канадский бальзам под покровные стекла.

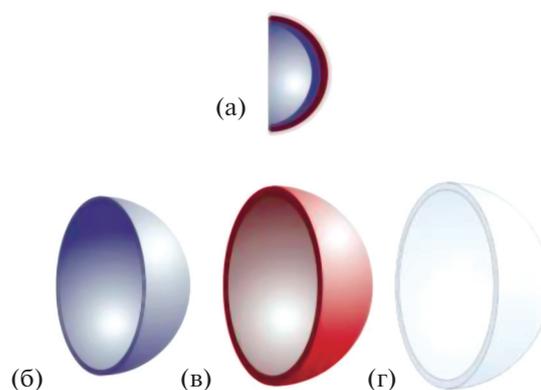


Рис. 1. Схема выделения тканей задней стенки глаза крысы. (а) — задняя стенка глаза, (б) — изоляция нейральной сетчатки, (в) — ретинального пигментного эпителия, (г) — остается сосудистая и склеральная оболочки. Подробное описание способа выделения тканей приведено в статье.

Анализ флуоресценции липофусциновых гранул

ЛФ — аутофлуоресцирующий пигмент глико-липпротеиновой природы. Для анализа флуоресценции препараты РПЭ через сутки после фиксации тщательно отмывали и заключали в глицерин с добавлением DABCO (Sigma, США) — протектора флуоресценции. Наличие гранул ЛФ проводили методом регистрации их флуоресценции с помощью флуоресцентного микроскопа AxioVev + 200M (Carl Zeiss Jena, Germany). Изображения получали в коротковолновом диапазоне света (488 нм) аргонового лазера (барьерный фильтр 570 нм) и при тождественных других параметрах работы микроскопа. Полученные изображения регистрировали с помощью цифровой камеры и компьютера, оснащенного программой AxioVision LE Rel.4.3.

Количественный анализ содержания ЛФ гранул в РПЭ крыс альбиносов через 2 нед., 1 мес. и 2 мес. после рождения проводили с помощью визуального подсчета числа клеток, содержащих обилие ярко флуоресцирующих гранул относительно общего числа клеток, на 20 полях визуального обзора размером 16 × 104 рх на изображениях пластов РПЭ, полученных при 1000-кратных увеличениях микроскопа (Об. 100×, Ок. 10×). Клетки с гранулами слабого свечения на грани идентификации или с незначительным их числом не учитывали. Этим намеренно понижали уровень содержания ЛФ в РПЭ, ставя перед собой задачу — не допустить значительной погрешности подсчетов и дать сравнительную характеристику клеток РПЭ крыс разного возраста по параметру относительного числа флуоресцирующих клеток в слое. Подсчеты проводили на черно-белых изображениях препаратов РПЭ, полученных от обоих глаз 2-х крыс для каждого срока. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel. Был рассчитаны средние значе-

ния показателя для каждого возраста, средне-квадратичное отклонение и проведен дисперсионный анализ выборок.

Определение соотношения одноядерных и двуядерных клеток в слое РПЭ

Для этой цели использовали фиксированные парами формалина и окрашенные гематоксилин-эозином препараты РПЭ глаз крыс в возрасте 2 нед., 1 мес. и 2 мес. В подсчетах учитывали только экваториальную область слоя по всей его окружности, периферия и центральная (вокруг головки зрительного нерва) области РПЭ оставались за пределами количественного анализа. Это связано с приведенными в литературе данными, согласно которым у трехмесячных крыс альбиносов Wistar на периферии многие клетки РПЭ часто имеют атипичную морфологию и нечеткие границы (Adams et al., 2010). По нашим наблюдениям в центральной области вблизи головки зрительного нерва морфология и распределение клеток РПЭ были нерегулярными, что также существенно осложняло количественные исследования. По этой причине центральная область была оставлена за пределами наших подсчетов. Подобные изменения отсутствовали в выбранной нами экваториальной области, намного более значительной по размерам области слоя РПЭ (примерное соотношение в мм от крайней периферии к центру: 0.5/1.5/0.5).

Для проведения подсчета клеток гистологические препараты РПЭ исследовали с помощью микроскопа Olympus АН-3, оснащенного цифровой камерой. Для каждого препарата делали серию снимков экваториальной зоны РПЭ. На каждом из полученных изображений брались прямоугольные площадки, на которых проводили подсчет сначала двуядерных, потом одноядерных клеток при помощи программы Image J. После этого определяли отношения числа одноядерных клеток к двуядерным. Затем проводили статистическую обработку данных с помощью программы Excel. Был сделан расчет средних значений показателей для каждого возраста, среднеквадратичных отклонений и дисперсионный анализ выборок для определения достоверности отличий в выборках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РПЭ нормального глаза взрослой крысы альбиноса 2-х месячного возраста представляет собой однорядный слой шестигранных клеток, плотно прилежащих друг к другу (рис. 2а). Клетки РПЭ являются одноядерными или двуядерными, а их соотношение зависит от возраста животного (Chen et al., 2016). Большинство клеток РПЭ крыс в возрасте месяц и более имеет два равных по размерам ядра, содержащих обычно 1–2 ядрышка (рис. 3а). Помимо двуядерных клеток, в небольшом относительном числе присутствуют одно-

ядерные клетки, размер ядер которых часто больше, чем у двуядерных клеток (рис. 3б, 3в, 3г). В популяции двуядерных и одноядерных клеток встречались и необычно крупные, имеющие примерно в полтора раза больший диаметр одноядерные клетки. Важно отметить, что цитоплазма клеток РПЭ у крыс альбиносов не содержит меланиновых гранул и имеет равномерное гомогенное светлое окрашивание при использовании гематоксилин-эозина. При сравнении с пигментированным РПЭ мышей C57Bl, взятым нами в качестве дополнительного образца, это отличие очевидно (рис. 4а, 4б). Известно, что основной отличительной чертой РПЭ альбиносов в развитии является не только отсутствие пигмента, но и компонентов его синтеза, участвующих также в регуляции клеточных циклов в сетчатке. Так, например, низкий уровень дегидроксифенилаланина (ДОФА) – предшественника синтеза меланина может оказывать влияние на процесс выхода клеток из цикла, что, в свою очередь, может приводить как к избыточной пролиферации, так и клеточной гибели (Pia, Jeffery, 1999). С этим явлением некоторые авторы (Adams et al., 2010) связывают частые случаи нарушений цитокинеза и других аномалий в популяции клеток РПЭ, в особенности его периферического отдела, поздно дифференцирующегося в развитии и обладающего хоть и очень низкой, но большей относительно экваториального и центрального отделов слоя, пролиферативной активностью (Al-Hussaini et al., 2008).

Эта особенность – отсутствие гранул меланина (или, возможно, крайне низкое их число), имеющая место в использованной модели, позволяет достаточно точно определить включения ЛФ в цитоплазме клеток, накапливаемые в процессе фагоцитирования. При исследовании полей РПЭ, относящихся к разным зонам экваториальной области слоя, нами не выявлено существенных клеточных морфологических отличий. Фигуры митотических делений ядер в РПЭ в образцах, полученных от 4-х глаз 2-х животных на каждый срок, не обнаружены.

На срезах задней стенки нормального глаза крыс альбиносов РПЭ расположен между нейральной сетчаткой и сосудистой оболочкой. Он образует однорядный, непигментированный, эпителий, состоящий из двуядерных и одноядерных клеток, плотно прилежащих друг к другу латеральными поверхностями. С базальной стороны слой выстилает мембрана Бруха и сосудистая (хороидальная) оболочка (рис. 2а). Эти три слоя в норме плотно расположены относительно друг друга и вместе представляют собой самостоятельный комплекс. Сосудистая оболочка у крыс имеет развитую неоднородную структуру – сосудистую сеть, состоящую из кровеносных сосудов разного калибра. Клеточными элементами сосудистой оболочки являются также клетки эндотелия сосудов и отростчатые, не содержащие пигмента “мелано-

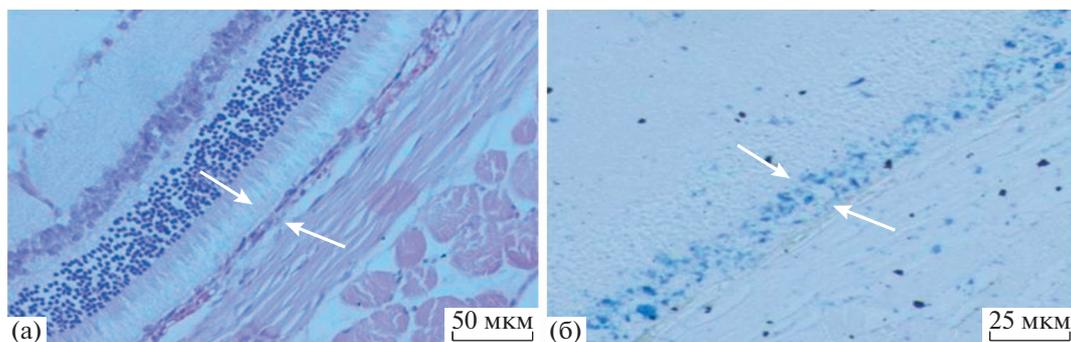


Рис. 2. Поперечный срез задней стенки глаза крысы альбиноса в возрасте 2 мес. (а) – нормальное строение, окраска гематоксилин-эозин (б) – окраска по методу Шморля. Стрелками указана область прилежащих друг к другу окончаний фоторецепторных отростков, ретинального пигментного эпителия и сосудистой оболочки.

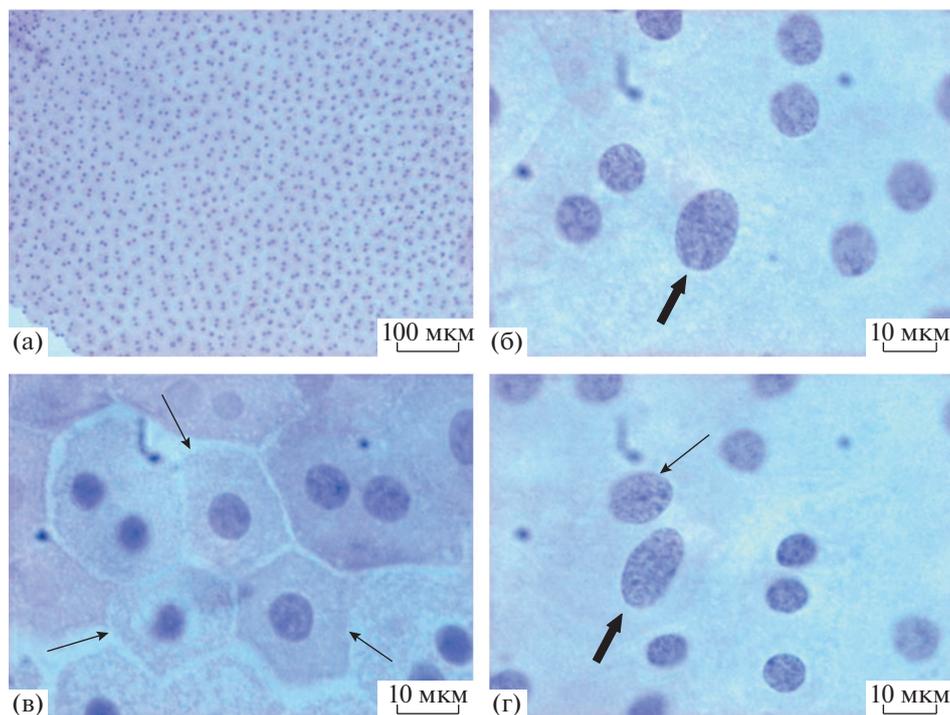


Рис. 3. Выделенный слой ретинального пигментного эпителия крысы альбиноса в возрасте 2 мес. (а) – общий вид; (б, в, г) – фрагменты при высоких разрешениях микроскопа. Тонкие стрелки – одноядерные клетки; толстые стрелки – клетки, имеющие крупные овальные ядра.

форы”, фибробласты, тучные клетки, резидентные макрофаги (рис. 5а). За сосудистой оболочкой следует плотная, склеральная соединительнотканная оболочка, обеспечивающая механическое напряжение и сохранение топологии РПЭ и сосудистой оболочки.

ЛФ гранулы являются обладающими аутофлуоресценцией, электронноплотными, гетерогенными, полимерными субстанциями, накапливаемыми внутри лизосомального вакуолярного аппарата (во вторичных лизосомах) клеток. Накопление происходит в течение всей жизни в линейной от возраста зависимости и является показателем (биомаркером) старения (Katz, 1989). Проведенное с помощью флуоресцентного микроскопа выявляе-

ние ЛФ и последующий количественный анализ относительного числа клеток, обладающих значительными количествами ЛФ, как по числу гранул, так и их флуоресценции, позволил судить о накоплении ЛФ в клетках РПЭ крыс альбиносов на отрезке времени от 2 нед. до 2 мес. после рождения. Эти результаты представлены на рис. 6 и 7. Следует отметить, что, по всей вероятности, в популяции крыс одного и того же возраста существуют отличия в числе интенсивно флуоресцирующих клеток в РПЭ, что с большой вероятностью связано с индивидуальными особенностями животных. При этом все же можно выявить определенные закономерности. Первая – это то, что уже в 2 недели постнатального развития у крыс

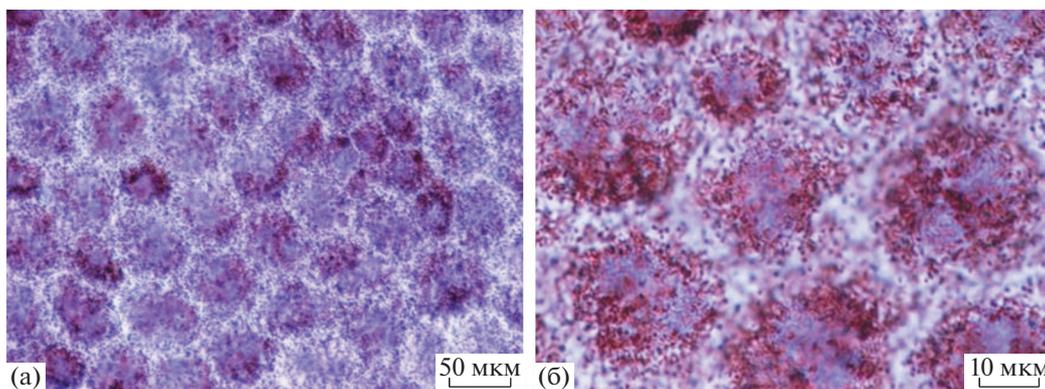


Рис. 4. Ретинальный пигментный эпителий взрослой мыши C57Bl при различных разрешениях микроскопа.

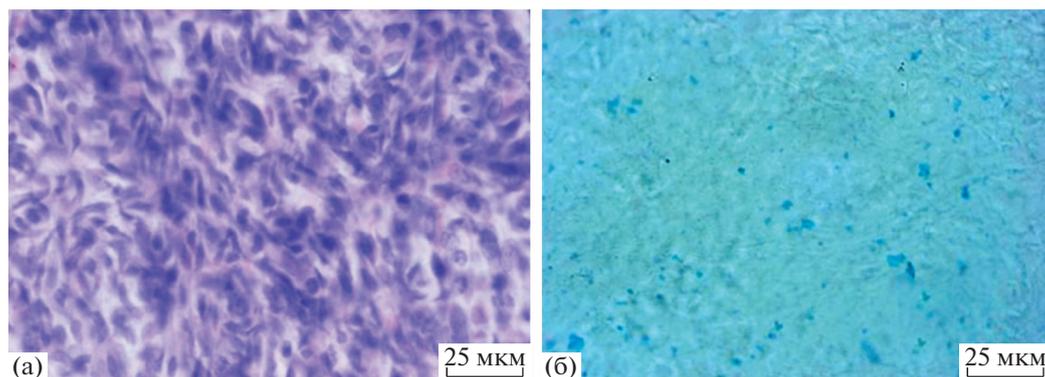


Рис. 5. Сосудистая оболочка глаза крысы альбиноса в возрасте 1 мес. (а) – общий вид, окраска – гематоксилин-эозин; (б) – окрашивание по методу Шморля.

альбиносов в экваториальной зоне РПЭ выявляются ЛФ-содержащие клетки, относительное содержание которых, однако, не превышает 10%. Флуоресценция ЛФ при этом чаще всего носит диффузный характер. Клетки с флуоресцирующей цитоплазмой могут быть обнаружены как в группах, так и отдельных клетках.

Позже уже к 1 мес. развития число таких клеток значительно увеличивается и 2 месяцам достигает уже 17–20% (рис. 7). Межгрупповой анализ выявил достоверные отличия между средними значениями показателя при сравнении возрастов 2 нед. и 1 мес. ($p < 0.01$). По мере возрастания относительного числа ЛФ – содержащих клеток, увеличивается и разброс этого показателя в образцах. Таким образом, очевидно, что накопление ЛФ в РПЭ глаза крыс альбиносов с возрастом является для этих животных естественным процессом, имеющим место вскоре после рождения и происходящим достаточно быстро в коротком интервале времени от 2 нед. до 2 мес. В чем же причина столь быстрого появления данного признака старения? Существуют работы, прямо указывающие на обратную связь наличия меланина (меланосом) с накоплением ЛФ в клетках РПЭ. В работе (Sundelin et al., 2001) исследовали РПЭ кролика и быка в условиях оксидативного стресса *in vitro*, вызван-

ного добавлением к клеткам РПЭ препарата наружных сегментов фоторецепторных клеток. Авторы сравнивали РПЭ нормальных кроликов и альбиносов, а также клетки РПЭ быка, богатые и обедненные меланиновыми гранулами. Было показано, что клетки РПЭ кроликов альбиносов и РПЭ быка с низким содержанием меланина аккумулировали значительно большие количества ЛФ по сравнению с содержанием ЛФ в клетках РПЭ нормальных кроликов, а также клетках РПЭ быка, богатых меланином. Работа, по мнению авторов (Sundelin et al., 2001), свидетельствовала о том, что меланин является эффективным антиоксидантом, что, в свою очередь, вероятно, обусловлено связью меланина с процессом переноса металлов. Предполагается также, что отсутствие меланинового пигмента в РПЭ может также обуславливать нарушение межклеточной коммуникации, осуществляемой через контакты не только на латеральных поверхностях клеток РПЭ, но и с нейральной сетчаткой по мере ее развития, что приводит к нарушению клеточной интеграции (Iwai et al., 2016). Это может проявляться в изменении формы клеток, а также в изменениях процесса фосфорилирования белков клеточных контактов и их сборки.

Полученные препараты РПЭ крыс альбиносов, окрашенные по методу Шморля для выявле-

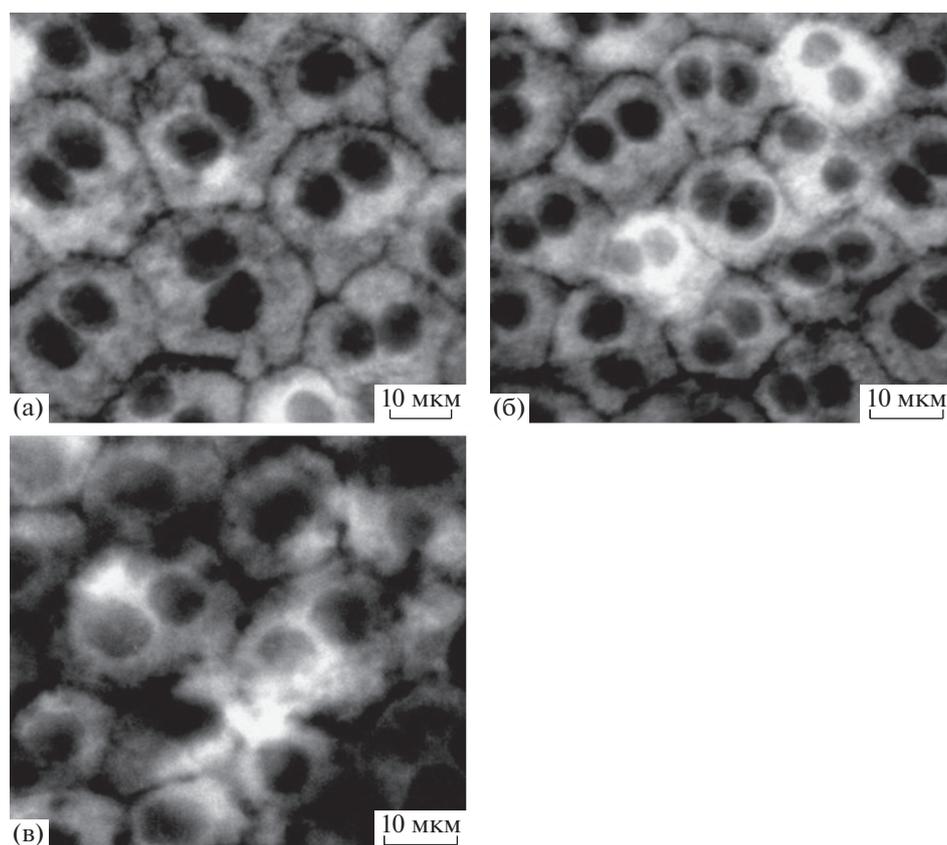


Рис. 6. Аутофлуоресценция в клетках ретинального пигментного эпителия крыс альбиносов в возрасте: (а) – 2 нед., (б) – 1 мес., (в) – 2 мес. после рождения.

ния ЛФ, дали возможность провести дополнительный анализ РПЭ у развивающейся крысы альбиноса. Проведение количественного анализа при таком подходе ограничено в связи с особенностями любой гистологической окраски, интенсивность которой зависит от многих факторов. Тем не менее, метод позволил обнаружить окрашенные (темно-голубые) включения как на поперечных срезах задней стенки глаза крыс (рис. 2б), так и на препаратах РПЭ whole amount (рис. 8а, 8б, 8в, 8г). На поперечных срезах окрашенные включения локализовались в клетках РПЭ на границе с фоторецепторами сетчатки, а также в сосудистой оболочке (рис. 2б). Такая локализация окрашивания была очевиднее у крыс в возрасте 2 мес., чем у крыс более раннего возраста. На ранних сроках развития (2 нед. и 1 мес.) (не показано) концентрация была незначительной, часто на грани фонового включения красителя. В целом эти результаты соответствовали данным, полученным при оценке накопления ЛФ с помощью флуоресцентного микроскопа, свидетельствующим в целом о наличии ЛФ на всех сроках наблюдения, и с максимумом 20% у двухмесячных крыс альбиносов.

Интересно, что в задней стенке глаза двухмесячных крыс, помимо РПЭ, специфическое окрашивание присутствовало также в сосудистой обо-

лочке (рис. 5б). Наличие ЛФ в сосудистой оболочке отмечалось и на более ранних сроках на окрашенных по методу Шморля парафиновых срезах. Недавно было описано накопление с возрастом ЛФ как результат перекисления липидов в сосудах сетчатки глаза человека (Nag et al., 2019).

Таким образом, выявленное в работе раннее накопление ЛФ в клетках РПЭ и сосудистой оболочке может являться свидетельством наличия одного из признаков старения РПЭ у крыс альбиносов уже в раннем постнатальном возрасте. Накопление ЛФ было показано также для ткани слезных желез стареющих (в возрасте от 2 до 24 мес.) крыс. Авторы (Batista et al., 2011) показали, что накопление ЛФ происходит на фоне падения экспрессии различных антиоксидантных маркеров, что свидетельствует об угнетении с возрастом антиоксидантной защиты, в свою очередь приводящей, в частности, к накоплению ЛФ и других признаков старения.

Определение соотношения, в котором находятся одноядерные и двухядерные клетки в экваториальной области слоя РПЭ крыс разного возраста дало результаты, представленные на рис. 9. Из данных гистограммы следует, что через две недели постнатального развития крыс альбиносов в экваториальной зоне РПЭ присутствует еще зна-

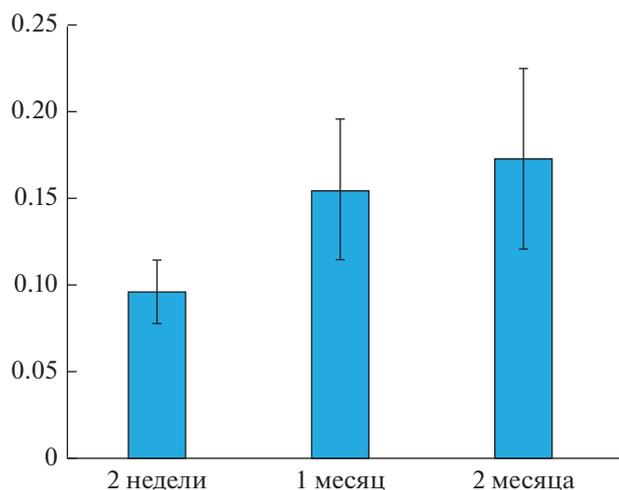


Рис. 7. Увеличение числа клеток, обладающих высокой ЛФ флуоресценцией в ретинальном пигментном эпителии крыс альбиносов в раннем развитии. По оси ординат среднее относительное число клеток с высоким уровнем флуоресценции к числу всех клеток на анализируемом поле изображения слоя РПЭ.

чительное число одноядерных клеток, однако, уже к первому месяцу постнатального развития крыс их содержание значительно снижается, и позже эта тенденция сохраняется. Межгрупповой анализ выявил достоверные отличия между фи-

нальными средними значениями соотношения одно- и двуядерных клеток при сравнении возрастов крыс 2 нед. и 1 мес. ($p < 0.005$).

Из данных литературы известно, что РПЭ пигментированных грызунов накапливает двуядерные клетки уже на третьей постнатальной неделе (Bodenstein, Sidman, 1987). Согласно нашим данным крысы альбиносы уже через две недели постнатального развития имеют значительное число таких клеток в РПЭ, что в свою очередь может быть обусловлено одним из факторов альбинизма – недостаточным уровнем ДОФА. Последнее, в свою очередь, ответственно за выход клеток из цикла и, вероятно, цитокинез (Adams et al., 2010).

Интересен вопрос связи накопления ЛФ клетками РПЭ и развития в нем многоядерности. Согласно нашим наблюдениям накопление ЛФ происходит как в двуядерных, так и одноядерных клетках, но поскольку число одноядерных клеток на всех сроках наблюдения невелико, то определенно ответить на вопрос о связи скорости накопления ЛФ и нарушения цитокинеза, приводящего к многоядерности, пока нельзя. Однако при сравнении количественных результатов, представленных на рис. 7 и 9, можно выявить положительную корреляцию между исследуемыми нами этими двумя событиями.

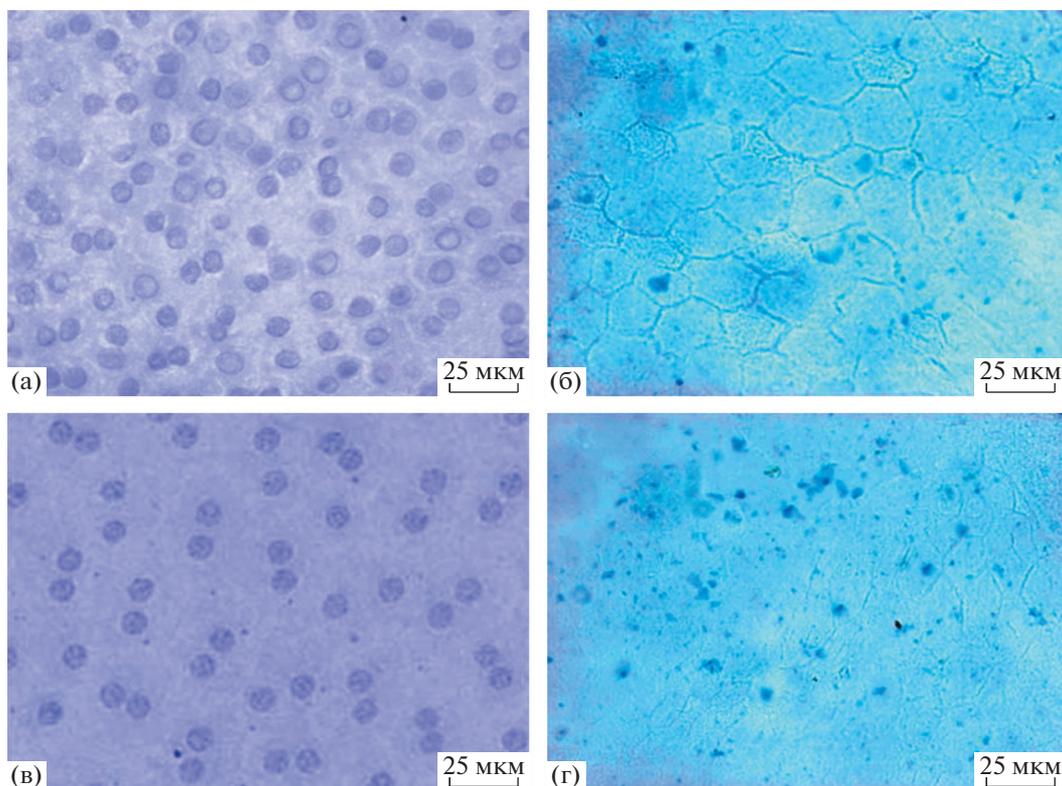


Рис. 8. Присутствие ЛФ гранул в изолированном ретинальном пигментном эпителии. (а) – окраска гематоксилин-эозином, 1 мес., (б) – окраска по методу Шморля, 1 мес., (в) – окраска гематоксилин-эозином, 2 мес., (г) – окраска по методу Шморля, 2 мес.

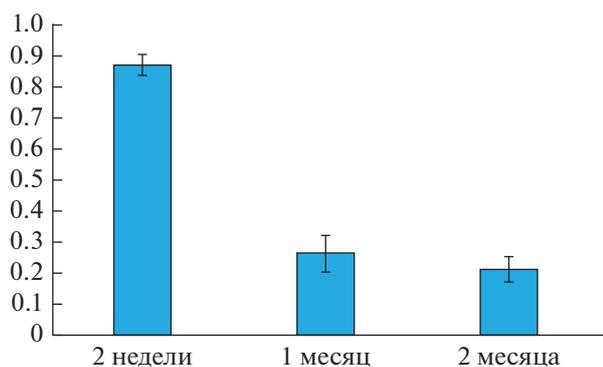


Рис. 9. Изменение соотношения одноядерных и двуядерных клеток в ретинальном пигментном эпителии крыс альбиносов в раннем возрасте. По оси ординат — отношение числа одноядерных клеток к числу двуядерных клеток на анализируемом поле изображения слоя РПЭ.

Данные работы, полученные на РПЭ крыс альбиносов раннего возраста, косвенно подтверждают и дополняют сведения о роли меланина в клетках РПЭ как необходимого участника поддержания гомеостаза, защиты от избыточного света, развития и старения сетчатки глаза. Выявленное нами появление таких признаков как наличие и аккумуляция ЛФ, а также наличие высокого относительного числа двуядерных клеток в РПЭ у крыс альбиносов в раннем постнатальном развитии связаны, безусловно, с отсутствием меланина. Оба процесса свидетельствуют также о раннем старении РПЭ у крыс альбиносов, что должно учитываться при проведении офтальмологических медико-биологических исследований на этом животном модельном объекте.

ВЫВОДЫ

РПЭ глаза крысы альбиноса уже на ранних стадиях постнатального развития приобретает признаки старения. Это выражается в накоплении клетками липофусциновых гранул, а также в увеличении относительного содержания двуядерных полиплоидных клеток в слое. В первые две недели постнатального развития эти признаки выражены незначительно, однако уже к месяцу становятся очевидны. Причиной феномена раннего старения РПЭ у крыс альбиносов предполагается отсутствие меланина, предохраняющего от переокисления, и компонентов синтеза меланина — регуляторов цитокинеза. Данные дополняют сведения о состоянии РПЭ крыс альбиносов, используемых в экспериментах *in vivo* и *in vitro* в качестве животной модели при изучении старения и патологии сетчатки глаза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.В. Килиной (МГУ) за помощь на начальном этапе проведения экспериментов. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года (№ 0108-2020-0005).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Ю.П. Новикова участвовала в проведении экспериментов и в обработке данных, Э.Н. Григорян — в проведении экспериментов, анализе результатов и написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григорян Э.Н. Факторы компетенции клеток ретинального пигментного эпителия для репрограммирования в нейрональном направлении при регенерации сетчатки у тритона // Известия РАН. Серия биологическая. 2014. № 1. С. 5–16.
- Новикова Ю.П., Ганчарова О.С., Эйхлер О.В. и др. Профилактическое и лечебное действие SkQ1-содержащих глазных капель визомитин при фотоиндуцируемых повреждениях сетчатки глаза // Биохимия (Москва). 2014. Т. 79. С. 1355–1366.
- Adams T., Shahabi G., Hoh-Kam J., Jeffery G. Held under arrest: Many mature albino RPE cells display polyploid features consistent with abnormal cell cycle retention // Exp. Eye Res. 2010. V. 90. № 2. P. 368–377.
- Al-Hussaini H., Vugler A., Semo M., Jeffery G. Mature mammalian retinal pigment epithelium cells proliferate *in vivo* // Mol. Vision. 2008. V. 14. P. 1784–1791.
- Batista T.M., Tomiyoshi L.M., Dias A.C. et al. Age-dependent changes in rat lacrimal gland anti-oxidant and vesicular related protein expression profiles // Mol. Vision. 2012. V. 18. P. 194–202.
- Bodenstein L., Sideman R. Growth and development of the mouse retinal pigment epithelium. Cell and tissue morphometrics and topography of mitotic activity // Develop. Biol. 1987. V. 121. P. 192–204.
- Chen M., Rajapakse D., Fraczek M. et al. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye — a

- mechanism to repair damage and maintain homeostasis // *Aging Cell*. 2016. V. 15. P. 436–445.
- Cortese K., Giordano F., Surace E.M. et al. The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2005. V. 46. № 12. P. 4358–4364.
- Grigoryan E.N., Novikova Y.P., Gancharova O.S. 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.
- Grønskov K., Ek J., Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism // *Orphanet. J. Rare Dis*. 2007. V. 2. P. 43–53.
- Gu X., Neric N.J., Crabb J.S., Crabb J.W. et al. Age-related changes in the retinal pigment epithelium (RPE) // *PLoS One*. 2012. 7. № 6. e38673.
- Gutteridge J.M.C. Fluorescent products of phospholipid peroxidation: formation and inhibition in model systems // *Ceroid Lipofuscinosis (Batten's Disease)* / Eds. Armstrong D., Koppang N., Rider J.A. Amsterdam. Elsevier Biomedical Press. 1982. P. 351–364.
- Ilija M., Jeffery G. Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle: analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinae // *J. Comp. Neurol*. 1999. V. 405. P. 394–405.
- Iwai L., Ramos A., Schaler A. et al. Retinal pigment epithelial integrity is compromised in the developing albino mouse retina // *J. Comp. Neurol*. 2016. V. 524. № 18. P. 3696–3716.
- Katz M.L. Incomplete proteolysis may contribute to lipofuscin accumulation in the retinal pigment epithelium // *Adv. Exp. Med. Biol*. 1989. V. 266. P. 109–116.
- Kennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review // *Eye (Lond.)*. 1995. V. 9. Pt. 6. P. 763–771.
- Mazzoni F., Safa H., Finnemann S.C. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture // *Exp. Eye Res*. 2014. V. 126. P. 51–60.
- Nadal-Nicolás F.M., Salinas-Navarro M., Jiménez-López M. et al. Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats // *Front. Neuroanat*. 2014. V. 8. P. 99–105.
- Nag T.C., Maurya M., Sankar Roy T. Age-related changes of the human retinal vessels: Possible involvement of lipid peroxidation // *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*. 2019. V. 226. P. 35–47.
- Rożanowska M. Properties and functions of ocular melanins and melanosomes // *Melanins and Melanogenesis: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological and Pathological Functions* / Eds. Borovansky J., Riley P.A. Wiley-Blackwell. Weinheim. Germany, 2011. P. 187–224.
- Sarna T. Properties and function of ocular melanin—a photophysical view // *J. Photochem. Photobiol. Biol. B*. 1992. V. 12. P. 215–258.
- Smith R.T., Farsiu S., Allingham M. Understanding RPE Lipofuscin // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2016. V. 57. № 15. P. 6766–6772.
- Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C.P. The retinal pigment epithelium in health and disease // *Curr. Mol. Med*. 2010. V. 10. № 9. P. 802–823.
- Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // *Physiol. Rev*. 2005. V. 85. № 3. P. 845–881.
- Summers C.G. Albinism: Classification, clinical characteristics, and recent findings // *Optom. Vis. Sci*. 2009. V. 86. P. 659–662.
- Sundelin S.P., Nilsson S.E.G., Brunk U.T. Lipofuscin formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to the melanin content // *Free Radical Biology & Medicine*. 2001. V. 30. № 1. P. 74–81.
- Wang N., Koutz CA., Anderson RE. A method for the isolation of retinal pigment epithelial cells from adult rats // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1993. V. 34. № 1. P. 101–107.
- Young R.W. The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey // *J. Cell Biol*. 1971. V. 49. P. 303–309.

Early Appearance of Aging Signs in Retinal Pigment Epithelium in Young Albino Rats

Yu. P. Novikova^{1,*} and E. N. Grigoryan^{1,**}

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

*e-mail: info@idbras.ru

**e-mail: leonore@mail.ru

Retinal pigment epithelium (RPE) whose main functions are participation in perception of light and support of eye retina trophic and functioning, traditionally is a subject of numerous studies. The majority of them has a biomedical character and aimed at a detection of causes of RPE aging and degeneration associated in turn with some serious, leading to vision loss, retinal diseases. Rodents and, albino rats Wistar in particular, often serve as an object of these studies. Our work is aimed at detection of aging signs in RPE of young (from 2 weeks to 2 months) albino rats. By means of fluorescent analysis and staining method by Schmorl, an accumulation of “pigment of aging” – lipofuscin as well as high content of polyploid double nuclei cells in relation to single nucleus ones was revealed in isolated whole amount RPE of young albino rats. A presence of lipofuscin in isolated, underlying RPE choroidal coat was observed in parallel. An interrelation between early appearance of aging signs in young RPE of albino rats found in the work and an absence of melanin pigment in cells of this tissue is discussed. The results obtained are recommended to consider when conducting experimental ophthalmological studies on this animal model.

Keywords: albino rat, eye, development, retinal pigment epithelium, lipofuscin, melanin, multinucleation

УДК 581.14

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГОЛОПЛОИДНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДНК С ЖИЗНЕННОЙ ФОРМОЙ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА РАСТЕНИЙ

© 2020 г. Н. Ф. Лунькова^а, Н. В. Жуковская^а, В. Б. Иванов^{а, *}^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Ботаническая улица, 35, Москва, 127276 Россия

*e-mail: ivanov_vb@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята к публикации 04.07.2020 г.

Величина генома является одним из важных эндогенных факторов, определяющих особенности роста и развитие растений. Голоплоидное содержание ДНК (C-value) у растений варьирует в очень широких пределах. В статье анализируется новая база данных по голоплоидному содержанию ДНК у разных видов покрытосеменных, опубликованная в интернете Ботаническим садом Кью (Лондон, Англия), где собраны данные для 10770 видов покрытосеменных растений (6633 видов двудольных и 4006 видов однодольных), что превышает предыдущие выпуски этой базы. Показаны четкие различия по голоплоидному содержанию ДНК между разными жизненными формами и проанализированы корреляции между C-value и скоростями прохождения жизненного цикла и другими процессами. Данные корреляции не являются однозначными и зависят от сложного сочетания разных факторов, таких как происхождение, климатические условия и др.

Ключевые слова: голоплоидное содержание ДНК, жизненная форма, однодольные, двудольные, од-нолетники, многолетники, рост, развитие

DOI: 10.31857/S047514502006004X

ВВЕДЕНИЕ

Термин “голоплоидное содержание ДНК” (от греческого holos – полный) обозначает содержание ядерной ДНК в нереплицированном гаплоидном наборе хромосом. Такое же значение имеют термины C-value (или 1C), при этом символ “C” образован от слова constant – постоянный, что подчеркивает постоянство содержания ядерной ДНК в разных тканях организма. Кроме 1C возможно использование и других префиксов – 2C, 3C и т.д. Так, 2C обозначает содержание ДНК в нередуцированном нереплицированном наборе хромосом (2n). Однако термины “голоплоидный размер генома” или “голоплоидное содержание ДНК” соответствуют термину “C-value” (или 1C) (Bennett, Smith, 1976; Greilhuber et al., 2005; Шереметьев и др., 2011).

Голоплоидное содержание ДНК у покрытосеменных растений варьирует в очень широких пределах: от 0.065 пг у *Genlisea aurea* (Fleischmann et al., 2014) до 152.23 пг у *Paris japonica* (Pellicer et al., 2010). Еще больший разброс данных по голоплоидному содержанию ДНК обнаруживается в целом у эукариот: от 0.009 пг у *Saccharomyces cerevisiae* до 700 пг у *Amoeba dubia* (Leitch et al., 1998;

Gregory, 2005). Несмотря на такой огромный разброс значений C-value, не прослеживается в целом четкой корреляции между фенотипической сложностью организма, его таксономическим положением и C-value. Это явление получило название C-value paradox (Thomas, 1971; Gregory, 2001). Значения C-value могут значительно отличаться у растений не только из разных семейств, но и в пределах одного семейства и даже рода. Так, например, два подрода *Genlisea* отличаются друг от друга по значениям C-value в 20 раз (Fleischmann et al., 2014). Тем не менее, некоторые исследования подтверждают наличие корреляции между C-value и различными морфологическими и физиологическими признаками (Greilhuber, Leitch, 2012). Показана взаимосвязь между значением C-value и размером меристематических и закончивших рост клеток в листьях (Beaulieu et al., 2008) и корнях (Simova, Herben, 2012; Жуковская и др., 2016), скоростью роста корней проростков (Gruner et al., 2010), размером и массой семян (Beaulieu et al., 2007), размером пыльцевых зерен (Beaulieu et al., 2008), длительностью митотического цикла в корнях (Van't Hof, Sparrow 1963; Van't Hof, 1967; Evans, Rees, 1971; Evans et al., 1972; Olszewska et al., 1990; Иванов, 1987, 2011; Francis et al., 2008), про-

Таблица 1. Среднее, минимальное, максимальное значение C-value и число видов у однодольных и двудольных растений разных жизненных форм

Группы растений	C-value среднее, пг	C-value min, пг	C-value max, пг	Число видов
Двудольные				
Деревья	1.16 ± 0.06	0.19	35.11	1035
Лианы	1.84 ± 0.24	0.21	15.8	126
Кустарники	1.68 ± 0.07	0.19	18.32	872
Полукустарники	3.1 ± 0.79	0.24	15.0	25
Травы	2.82 ± 0.05	0.07	44.6	4436
Паразиты	14.23 ± 2.11	0.58	102.9	71
Однодольные				
Пальмы	3.49 ± 0.30	0.76	30	119
Травы	9.77 ± 0.2	0.2	152.2	3872

Таблица 2. Среднее, минимальное, максимальное значение C-value и число видов у однодольных и двудольных трав с разной продолжительностью жизненного цикла, исключая двулетние виды и виды, у которых длительность жизненного цикла может меняться

Группы трав	C-value среднее, пг	C-value min, пг	C-value max, пг	Число видов
Двудольные				
Эфемеры	1.05 ± 0.20	0.16	2.3	15
Однолетние травы	2.27 ± 0.08	0.12	27.4	944
многолетние травы	3.15 ± 0.07	0.07	44.6	3039
Однодольные				
Эфемеры	4.72 ± 1.78	1.2	11.3	5
Однолетние травы	5.57 ± 0.29	0.28	26	283
Многолетние травы без лилиоидов	5.65 ± 0.14	0.2	49.9	2400
Лилиоиды	20.15 ± 0.52	0.35	152.2	1110

должительностью жизненного цикла (Bennett, 1972; Bennett, Smith, 1976; Иванов, 1978; Ivanov, 2010; Bennett and Leitch, 2011; Fleischmann et al., 2014), жизненной формой и распространением по климатическим зонам (Ohri, 2005; Шереметьев и др., 2011).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В базе данных “Plant DNA C-values Database” of Kew Royal Botanical Gardens (Leitch et al., 2019) собрана информация о значении C-value и продолжительности жизненного цикла 10770 видов покрытосеменных растений (6633 видов двудольных и 4006 видов однодольных), что превышает предыдущие выпуски этой базы. В данной статье был проведен анализ значений C-value у следующих жизненных форм растений: деревья, лианы, кустарники, полукустарники, пальмы, травы. Среди трав отдельно изучали однодольные и двудольные, а по длительности жизненного цикла выделяли следующие группы: эфемеры, однолетние и многолетние. Отдельно анализировали двулетние травы, а также такие травы, у которых длительность жизненного цикла меняется в зависи-

мости от условий, и они могут быть одно- или двулетними, одно- или многолетними, дву- или многолетними. Среди однодольных трав выделяли для анализа лилиоиды. Также отдельно рассматривали группу растений паразитов.

Данные обработаны в программах MS Excel 2007 и SigmaPlot 13.0 и представлены как средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены средние, минимальные и максимальные значения C-value у однодольных и двудольных растений разных жизненных форм для данного числа видов. Оказалось, что наименьшее среднее значение C-value у деревьев (1.16 пг). У лиан и кустарников оно несколько выше. У полукустарников и двудольных трав средние значения C-value примерно в 2.5 раза, а у однодольных трав почти в 8.5 раз выше, чем у деревьев. У пальм среднее значение C-value ниже, чем у травянистых однодольных. Наиболее высокие значения C-value обнаружены у группы растений паразитов. То, что среднее значение C-value у деревьев меньше, чем у трав, было показано ранее, но на

Таблица 3. Среднее, минимальное, максимальное значение C-value и число видов у однодольных и двудольных трав с продолжительностью жизненного цикла два года и с меняющейся продолжительностью жизненного цикла

Группы трав	C-value среднее, пг	C-value min, пг	C-value max, пг	Число видов
Двудольные травы				
Одно- и двулетние	2.22 ± 0.27	0.21	10.6	61
Двулетние	1.76 ± 0.18	0.2	8.98	100
Одно- и многолетние	1.53 ± 0.13	0.17	7.32	103
Дву- и многолетние	2.14 ± 0.43	0.35	8.66	27
Однодольные травы				
Одно- и двулетние	1.88 ± 0.62	0.5	4.3	6
Двулетние	1.56 ± 1.16	0.4	2.72	2
Одно- и многолетние	5.12 ± 0.94	0.93	16.1	19
Дву- и многолетние	0.69 ± 0.08	0.46	0.8	4

гораздо меньшем числе видов (Ohgi, 2005; Шереметьев и др., 2011; Гамалей, 2014; Иванов, 2014). Интересно отметить, что такая же закономерность выявляется даже в пределах одного семейства, что было показано на примере семейства Fabaceae (Ohgi, 2005), а также на целом ряде других семейств (Гамалей, Шереметьев, 2012; Шереметьев, Чеботарева, 2018), в которых были сопоставлены значения C-value древесных и травянистых форм. Шереметьев и Чеботарева (2018) также отмечали наибольший размер генома у трав в сравнении с кустарниками и деревьями. Эти авторы проанализировали индекс травянистости у неформальных групп филогенетической системы APG III (таксономическая система классификации цветковых растений), а также показали корреляцию между возрастом вершинных неформальных групп и размером их геномов. На основании полученных результатов было выдвинуто предположение, что может существовать связь между систематическим положением растений и размером геномов, однако на данном этапе накопленных знаний такой корреляции не выявляется. В то же время подчеркивается, что связь между размером генома прослеживается в большей степени не с систематическим положением группы, а составом ее жизненных форм. Также показано, что размер геномов увеличивается по мере увеличения вклада трав в таксономическое

разнообразии. В этой работе развито представление, что увеличение C-value в ходе эволюции связано с изменением спектра жизненных форм – возникновением и дальнейшей экспансией трав, у которых размер генома значительно больше, чем у деревьев. Увеличение размера генома имело адаптогенное значение и позволило значительно повысить функциональную активность важнейших процессов, что было показано на разных примерах. Травы получили возможность более широкого расселения и большей приспособляемости к внешним условиям. Таким образом, увеличение размера генома было необходимо для формирования биологического разнообразия, связанного с распространением трав в условиях меняющегося климата Земли. В нашу задачу не входил более детальный анализ этих проблем. Можно, однако, отметить, что корреляции между размерами генома и экологией в современное время не столь однозначны. Например, лилиоиды с очень большими геномами могут иметь узкие ареалы, а некоторые виды из других семейств, например, крестоцветных, с малыми геномами успешно растут в разнообразных условиях.

В нашей работе показано, что у трав по мере увеличения длительности жизненного цикла в ряду эфемеры – однолетние – многолетние возрастает голоплоидное содержание ДНК (табл. 2). При этом стоит отметить, что C-value у однодоль-

Таблица 4. Среднее, минимальное, максимальное значение C-value и число видов у орхидей из умеренного и тропического климата

C-value, пг	Орхидеи	
	умеренного климата	тропического климата
Среднее	13.21 ± 2.63	5.87 ± 0.39
Минимум	2.89	0.38
Максимум	37.4	44.84
Число видов	15	410

Таблица 5. Среднее, минимальное, максимальное значение C-value и число видов у деревьев из умеренного и тропического климата

C-value, пг	Деревья	
	умеренного климата	тропического климата
Среднее	0.94 ± 0.11	1.17 ± 0.06
Минимум	0.33	0.19
Максимум	3.4	35.11
Число видов	41	994

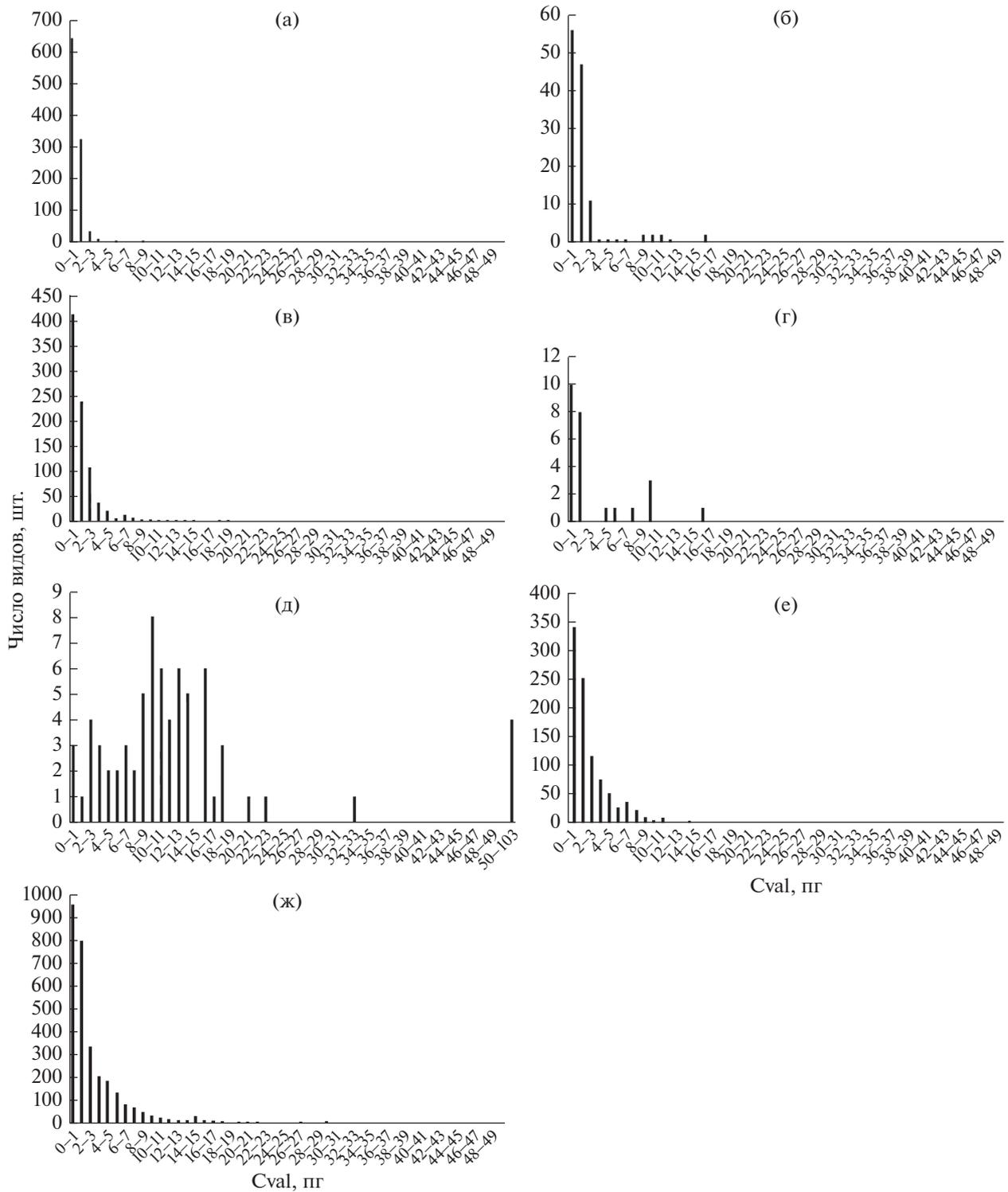


Рис. 1. Распределение числа видов у разных жизненных форм двудольных в зависимости от значений C-value: деревья (а), лианы (б), кустарники (в), полукустарники (г), паразиты (д), однолетние (е) и многолетние (ж) травы.

ных трав выше, чем у двудольных. Особенно резко отличается группа лилиоидов, у которых среднее значение C-value в 3.5 раза выше, чем у остальных однодольных многолетних трав. Однако двулетние травы, а также виды трав, которые

могут иметь разную продолжительность жизненного цикла (одно- и двулетние, одно- и многолетние, дву- и многолетние) имеют средние значения C-value даже ниже, чем у однолетних (табл. 2 и 3). Эта закономерность показана на небольшом чис-

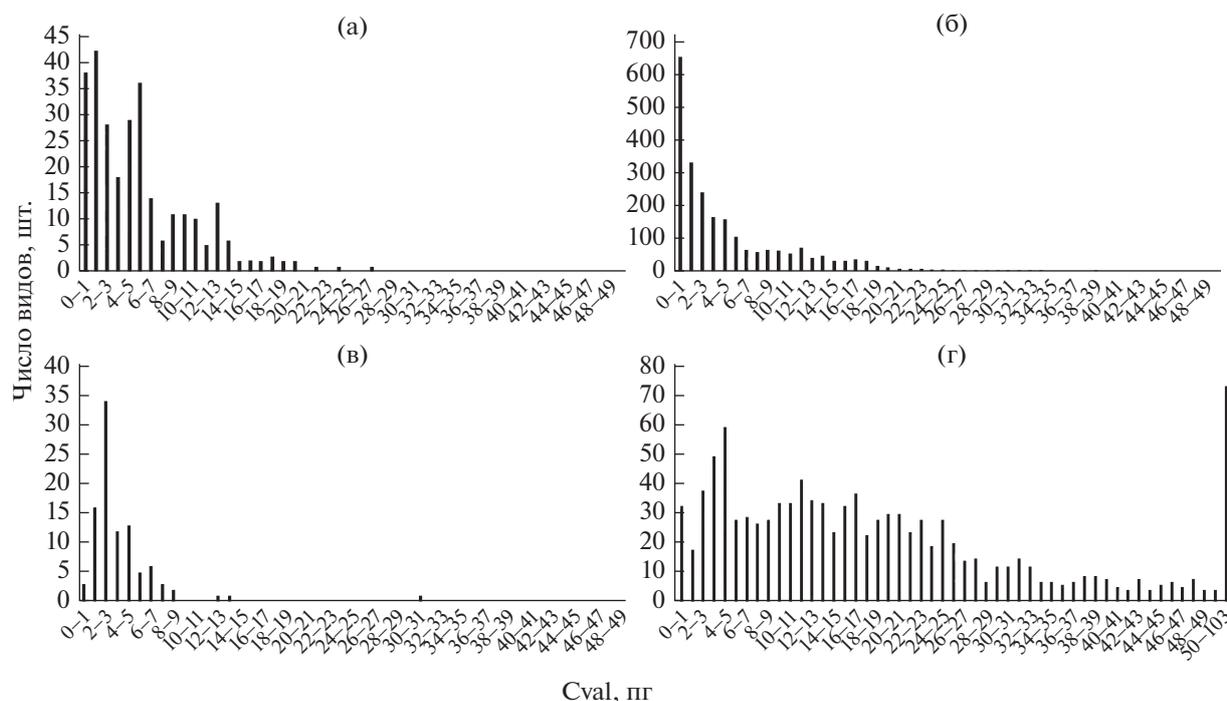


Рис. 2. Распределение числа видов однодольных в зависимости от значений C-value: однолетние (а) и многолетние травы без лилиоидов (б), пальмы (в), лилиоиды (г). (Примечание – на рис. 2г в последнем столбике сгруппировано число видов со значением C-value от 50 до 153 пг.)

ле видов как у двудольных, так и у однодольных трав и свидетельствует о непростом характере зависимости длительности жизненного цикла от голоплоидного содержания ДНК. Увеличение длительности жизненного цикла с возрастанием C-value, показанное в данной работе в ряду эфемеры – однолетние – многолетние травы, а также продемонстрированное в работах (Bennett, 1972, Иванов, 1978, 2014), согласуется с теорией о том, что голоплоидное содержание ДНК коррелирует с минимальной продолжительностью жизненного цикла (Bennett, 1972). Однако, представление о том, что увеличение длительности жизненного цикла коррелирует с увеличением голоплоидного содержания ДНК расходится с данными по значению C-value и продолжительности жизненного цикла у деревьев и кустарников в сравнении с травами. Есть предположение, что более низкое голоплоидное содержание ДНК наряду с более длительным жизненным циклом у деревьев и кустарников по сравнению с травами может быть связано с более ранним происхождением деревьев, когда климат на Земле был более теплый и влажный. Происхождение трав в период с менее благоприятными климатическими условиями сопровождалось увеличением голоплоидного содержания ДНК (Шереметьев и др., 2011; Гамалей, Шереметьев, 2012; Гамалей, 2014). Это представление согласуется с тем, что у растений, произрастающих в условиях более теплого климата,

значения C-value ниже, чем у растений из более северных регионов (Bennett, 1976; Grime et al., 1985). Результаты анализа значений C-value у видов орхидей из умеренного климата и более южных тропических видов (табл. 4) также подтверждают эту теорию. У более северных видов орхидей среднее значение C-value немногим более, чем в 2 раза выше, чем у южных видов. Однако у деревьев такая закономерность не прослеживается (табл. 5). У видов деревьев умеренного климата среднее значение C-value почти на 20% ниже, чем у южных. Этот факт требует дальнейшего исследования, хотя отчасти полученные данные могут быть связаны с маленьким числом изученных видов деревьев умеренного климата.

Интересно, что у промежуточных между деревьями и травами форм растений – кустарников и древесных лиан средние значения C-value занимают промежуточное положение между средними значениями C-value у деревьев и трав. У полукустарников, которые по форме скорее ближе к травам, средние значения C-value немного выше, чем у однолетних и ниже, чем у многолетних двудольных трав, а у пальм, которые являются крупными формами однодольных, средние значения C-value ниже, чем у малых травянистых форм однодольных (табл. 1). У паразитов, у которых идет упрощение ряда функций, средние значения C-value (14.23 пг) гораздо выше, чем у всех остальных изученных групп растений, кроме лилиоидов.

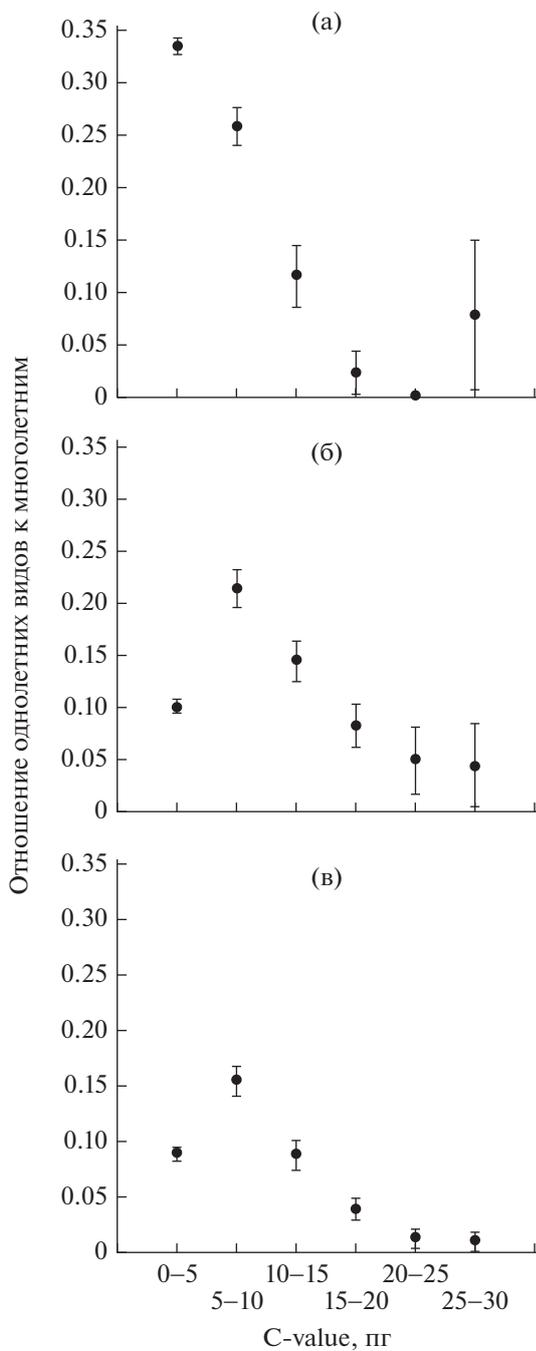


Рис. 3. Отношение числа однолетних видов к многолетним у двудольных (а) и однодольных без лилиоидов (б) и с лилиоидами (в).

На рис. 1 и 2 представлены гистограммы распределения числа видов разных жизненных форм растений в зависимости от значений C-value отдельно для однодольных и двудольных. Для трав данная зависимость рассматривалась отдельно для однолетних и многолетних видов, а у однодольных выделяли еще группу лилиоидов.

Число видов деревьев, имеющих значение C-value менее 2 пг, составляет 93.6% от всех изученных деревьев (рис. 1а). Далее в ряду деревья — лианы — кустарники — полукустарники — травы можно проследить увеличение доли видов с возрастанием значений C-value по мере продвижения по данному ряду жизненных форм по сравнению с деревьями (рис. 1а–1г, 1е, 1ж). При этом у всех двудольных, кроме паразитов, наибольшее число видов обладает значением C-value меньше 1 пг. Среди изученных однодольных наибольшее число видов со значением C-value меньше 1 пг наблюдается только в группе многолетних трав без учета лилиоидов (рис. 2б). У однодольных однолетних трав наибольшее число видов имеет значение C-value 1–2 пг (рис. 2а), у пальм 2–3 пг (рис. 2в), у лилиоидов 4–5 пг (рис. 2г). Пределы значений C-value, выше которых уже нет однолетних видов трав для однодольных 26 пг и для двудольных 27.4 пг (табл. 2) совпадают с обозначенными в работе (Ivanov, 2010). Общая тенденция у всех групп растений, кроме паразитов, в том, что наибольшее число видов обладает меньшим значением C-value. Стоит отметить, что у лилиоидов, которые не являются отдельной жизненной формой растений, а лишь частью группы однодольных многолетних трав распределение числа видов примерно одинаковое до 25 пг, в отличие от других групп растений.

При изучении отношения числа однолетних трав к числу многолетних в зависимости от значений C-value показано, что у двудольных наибольшая доля однолетних видов сосредоточена при C-value до 5 пг (рис. 3а), при этом отношение числа однолетних трав к числу многолетних составляет 0.34. При дальнейшем увеличении значений C-value доля однолетних падает. У однодольных доля однолетних видов максимальна при значениях C-value 5–10 пг (рис. 3б, 3в), а отношение числа однолетних трав к числу многолетних без учета лилиоидов составляет 0.21 и с учетом лилиоидов 0.15. Таким образом, у однодольных доля однолетних видов сначала увеличивается, а затем падает по мере увеличения значений C-value. Такой характер распределения доли однолетних видов у двудольных и однодольных представляет большой интерес и свидетельствует о том, что минимальная продолжительность жизненного цикла не всегда связана с меньшим содержанием C-value. Сложность зависимости минимальной продолжительности жизненного цикла от голоплоидного содержания ДНК подтверждается также данными, опубликованными в работе (Иванов, 2014) о том, что у многолетников, зацветающих в 1 и 2 год жизни средние значения C-value ниже, чем у многолетников, зацветающих позже 2 лет. Это показано как для двудольных, так и для однодольных видов.

В данной статье более подробно были проанализированы два семейства из двудольных (Asteraceae и Fabaceae) и одно семейство из однодольных

Таблица 6. Среднее значение C-value и число однолетних и многолетних видов в отдельных родах семейства Asteraceae

Род	Однолетние виды		Многолетние виды	
	C-value среднее, пг	число видов	C-value среднее, пг	число видов
<i>Agoseris</i>	1.1	1	2.9	3
<i>Ambrosia</i>	1.55	2	2.78	3
<i>Anacyclus</i>	5.80	3	6.20	1
<i>Andryala</i>	1.59	1	1.89	4
<i>Anthemis</i>	5.21	6	6.60	3
<i>Artemisia</i>	3.62	4	5.46	99
<i>Aster</i>	3.00	1	3.49	10
<i>Bellis</i>	1.44	1	1.81	2
<i>Calendula</i>	1.83	3	1.40	3
<i>Carduus</i>	4.30	1	1.83	3
<i>Centaurea</i>	0.96	4	1.46	59
<i>Chamaemelum</i>	4.50	2	5.3	1
<i>Chrysanthemum</i>	8.49	4	6.74	16
<i>Coreopsis</i>	1.60	1	2.59	3
<i>Cosmos</i>	2.25	2	7.34	1
<i>Crepis</i>	2.83	15	4.55	31
<i>Cyanus</i>	0.74	1	1.61	13
<i>Echinops</i>	1.59	2	4.12	35
<i>Guizotia</i>	2.73	3	3.37	3
<i>Haplopappus</i>	1.53	3	2.10	2
<i>Helianthus</i>	4.94	13	6.39	10
<i>Hypochaeris</i>	1.60	4	2.11	9
<i>Inula</i>	0.91	1	1.57	8
<i>Krigia</i>	1.50	1	2.67	1
<i>Lactuca</i>	2.22	3	3.02	10
<i>Leontodon</i>	0.40	1	1.26	7
<i>Leucanthemum</i>	7.50	2	12.30	13
<i>Melampodium</i>	1.67	17	3.38	4
<i>Microseris</i>	1.53	4	3.85	6
<i>Reichardia</i>	1.5	1	2.04	8
<i>Senecio</i>	3.77	20	6.52	61
<i>Sonchus</i>	1.15	2	1.59	12
<i>Tolpis</i>	2.9	1	1.41	6

Примечание — жирным шрифтом выделены те рода, у которых среднее значение C-value выше у однолетних видов, чем у многолетних.

(Роасеae). В каждом из этих семейств отобрали такие рода, в которых есть и однолетние и многолетние виды, и посчитали среднее значение C-value отдельно у однолетних и многолетних видов в каждом роду. При сопоставлении между собой средних значений C-value у однолетних и многолетних видов по каждому роду оказалось, что в большинстве случаев у многолетних видов среднее значение C-value больше, чем у однолетних, но все же для некоторых родов эта закономерность не соблюдалась (табл. 6–8). Это также является свидетельством того, что взаимосвязь между голоплоидным содержанием ДНК и многолетностью непростая.

Уже давно обсуждается то, что с увеличением C-value наблюдается замедление развития (Ива-

нов, 1978). В нашей работе показано, что у лилиоидов, обладающих признаками замедления развития (медленным прорастанием, поздним зацветанием, длительным мейозом) (Иванов, 2014), наибольшее среднее значение C-value (20.15 пг) не только из всех однодольных трав, но вообще из всех изученных групп покрытосеменных растений (табл. 1 и 2). Кроме того, к группе лилиоидов относится растение *Paris japonica* Franchet, имеющее самое большое значение C-value (152.23 пг) из всех изученных на данный момент растений (Pellicer et al., 2010). Характерной особенностью распределения числа лилиоидов в зависимости от значений C-value является то, что нет резкого пика числа видов с минимальным значением C-value, а само распределение более плавное, чем у

Таблица 7. Среднее значение C-value и число однолетних и многолетних видов в отдельных родах семейства Fabaceae

Род	Однолетние виды		Многолетние виды	
	C-value среднее, пг	число видов	C-value среднее, пг	число видов
<i>Arachis</i>	2.52	6	3.30	9
<i>Astragalus</i>	0.58	2	1.79	24
<i>Cicer</i>	1.2	7	1.36	1
<i>Crotalaria</i>	1.15	4	1.13	3
<i>Lathyrus</i>	6.87	33	8.76	33
<i>Lotus</i>	0.64	12	0.73	28
<i>Lupinus</i>	0.71	25	0.86	20
<i>Medicago</i>	0.61	9	1.28	7
<i>Phaseolus</i>	0.96	5	0.70	24
<i>Rhynchosia</i>	1.20	1	1.28	2
<i>Tephrosia</i>	1	3	2.55	2
<i>Trifolium</i>	1.11	8	1.92	6
<i>Vicia</i>	5.65	59	5.81	24
<i>Vigna</i>	0.62	9	0.78	6

Примечание — жирным шрифтом выделены те рода, у которых среднее значение C-value выше у однолетних видов, чем у многолетних.

Таблица 8. Среднее значение C-value и число однолетних и многолетних видов в отдельных родах семейства Poaceae

Род	Однолетние виды		Многолетние виды	
	C-value среднее, пг	число видов	C-value среднее, пг	число видов
<i>Agrostis</i>	2.19	2	4.73	17
<i>Alopecurus</i>	5.80	1	11.47	3
<i>Anthoxanthum</i>	6.49	2	7.48	5
<i>Avena</i>	7.65	31	10.89	1
<i>Brachypodium</i>	0.41	3	0.60	8
<i>Briza</i>	4.93	3	6.84	5
<i>Bromus</i>	7.76	29	8.47	32
<i>Cenchrus</i>	4.08	2	1.63	2
<i>Dasypyrum</i>	5.07	1	10.50	1
<i>Digitaria</i>	1.24	8	0.62	1
<i>Eleusine</i>	1.50	6	2.22	5
<i>Eragrostis</i>	0.72	2	1.15	1
<i>Hordeum</i>	8.16	19	7.59	31
<i>Lachnagrostis</i>	6.74	1	10.78	8
<i>Lolium</i>	2.66	5	4.10	4
<i>Milium</i>	4.00	2	3.90	1
<i>Oryza</i>	0.59	3	0.80	7
<i>Panicum</i>	1.36	6	1.93	3
<i>Pennisetum</i>	2.52	6	2.18	10
<i>Phalaris</i>	2.97	6	4.16	7
<i>Poa</i>	2.05	2	3.75	39
<i>Secale</i>	8.07	3	7.80	2
<i>Setaria</i>	1.30	5	1.70	6
<i>Sorghum</i>	2.64	25	3.11	7
<i>Vulpia</i>	2.30	1	4.23	4
<i>Zea</i>	3.65	2	3.95	2

Примечание — жирным шрифтом выделены те рода, у которых среднее значение C-value выше у однолетних видов, чем у многолетних.

остальных многолетних однодольных. У лилиоидов часто большие размеры меристем. Это обеспечивает им возможность быстрого роста весной, так как скорость роста зависит от числа клеток и продолжительности цикла. Однако то, что у лилиоидов нет однолетних видов даже при низких значениях *C-value* так же свидетельствует о том, что связь между голоплоидным содержанием ДНК и многолетностью не прямая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа последнего выпуска базы данных ботанического сада Кью в нашей работе показаны особенности распределения числа видов однодольных и двудольных растений разных жизненных форм, а также однолетних и многолетних трав в зависимости от значений *C-value*. С незначительными отличиями они во многом сходятся с показанными ранее на значительно меньшем числе видов в работах (Ivanov, 2010; Шереметьев и др., 2011; Шереметьев, Чеботарева 2018). Из приведенных результатов ясно, что сравнение средних значений *C-value* и длительности жизненного цикла недостаточно, чтобы решить вопрос о связи между *C-value* и жизненной формой растения. Можно предположить, что увеличение *C-value* приводит к замедлению развития, что четко прослеживается у лилиоидов, среди которых нет однолетних видов, однако изучение отдельных родов у семейств Asteraceae, Fabaceae и Poaceae показало, что для некоторых родов среднее значение *C-value* у однолетних видов было больше, чем у многолетних. Таким образом, механизм этой зависимости далеко неясен и требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С.Н. Шереметьеву за ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00918а) и Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (номер темы АААА-А19-119040290058-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Н.Ф. Лунькова и В.Б. Иванов внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гамалей Ю.В. Растительные формы палеогена и неогена // Труды IX Международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых. 2014. С. 129–132.
- Гамалей Ю.В., Шереметьев С.Н. Направления эволюции генома наземных и вторично-водных трав // Цитология. 2012. Т. 54. № 6. С. 449–458.
- Жуковская Н.В., Быстрова Е.И., Иванов В.Б. Зависимость размеров меристематических и закончивших рост клеток от содержания ДНК в расчете на гаплоидное число хромосом // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 6. С. 346–356.
- Иванов В.Б. Содержание ДНК в ядре и скорость развития растений // Онтогенез. 1978. Т. 9. С. 39–53.
- Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с.
- Иванов В.Б. Корреляция между содержанием ДНК в геноме и жизненной формой растений // Труды IX Международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых. 2014. С. 203–206.
- Шереметьев С.Н., Гамалей Ю.В., Слемнев Н.Н. Направления эволюции генома покрытосеменных // Цитология. 2011. Т. 53. С. 295–312.
- Шереметьев С.Н., Чеботарева К.Е. Современная и мел-кайнозойская диверсификация покрытосеменных // Журн. общей биологии. 2018. Т. 79. № 1. С. 28–54.
- Beaulieu J.M., Moles A.T., Leitch I.J., Bennett M.D., Dickie J.B., Knight C.A. Correlated evolution of genome size and seed mass // *New Phytol.* 2007. V. 173. P. 422–437.
- Beaulieu J.M., Leitch I.J., Patel S. et al. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms // *New Phytol.* 2008. V. 179. P. 975–986.
- Bennett M. Nuclear DNA content and minimum generation time // *Proc. RL. Soc. Lond. B.* 1972. V. 181. P. 109–135.
- Bennett M.D., Leitch I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow // *Annals Bot.* 2011. V. 107. P. 467–590.
- Bennett M.D., Smith J.B. Nuclear DNA amounts in angiosperms // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences.* 1976. V. 274. P. 227–274.
- Evans G.M., Rees H. Mitotic cycles in Dicotyledons and Monocotyledons // *Nature.* 1971. V. 233. P. 350–351.
- Evans G.M., Rees H., Snell C.L. et al. The relationship between nuclear DNA amount and time duration of the mitotic cycle // *Chromosome Today.* 1972. V. 3. P. 24–31.
- Fleischmann A., Michael T.P., Rivadavia F. et al. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a

- new estimate of the minimum genome size in angiosperms // *Annals Bot.* 2014. V. 114. P. 1651–1663.
- Francis D., Davies M.S., Barlow P.W. A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level // *Annals Bot.* 2008. V. 101. P. 747–757.
- Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // *Biol. Rev.* 2001. V. 76. P. 65–101.
- Gregory T.R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership // *Annals Bot.* 2005. V. 95. P. 133–146.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M.A. et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘Genome Size’ and ‘C-Value’ to describe nuclear DNA contents // *Annals Bot.* 2005. V. 95. P. 255–260.
- Greilhuber J., Leitch I.J. *Plant Genome Diversity. Vol. 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes.* Springer, 2012. 352 p.
- Grime J.P., Shacklock M.L., Band S.R. Nuclear DNA contents, shoot phenology and species co-existence in a limestone grassland community // *New Phytol.* 1985. V. 100. № 3. P. 435–445.
- Gruner A., Howerter N., Smith T. et al. Genome size is a strong predictor of root meristem growth rate // *J. Botany.* 2010. P. 1–4.
- Ivanov V.B. Ambiguous dependence of minimal plant generation time on nuclear DNA content // *Nat. Preced.* 2010. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.4943.1>
- Leitch I.J., Chase M.W., Bennett M.D. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants // *Annals Bot.* 1998. V. 82. P. 85–94.
- Leitch I.J., Johnston E., Pellicer J. et al. *Plant DNA C-values Database (Release 7.1).* 2019. <https://cvalues.science.kew.org/>.
- Ohri O. Climate and Growth Form. The consequences for Genome Size in Plants // *Plant Biol.* 2005. V. 7. P. 449–458.
- Olszewska M.J., Bilecka A., Kuran H. et al. Dry mass and protein increase during interphase as a possible factor regulating the cell cycle duration // *Caryologia.* 1990. V. 43. P. 43–55.
- Pellicer J., Fay M.F., Leitch I.J. The largest eukaryotic genome of them all? // *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2010. V. 164. P. 10–15.
- Simova I., Herben T. Geometrical constraints in the scaling relationships between genome size, cell size and cell cycle length in herbaceous plants // *Proc. R. Soc. B.* 2012. V. 279. P. 867–875.
- Thomas C.A. The genetic organization of chromosomes // *Ann. Rev. Genet.* 1971. P. 237–256.
- Van't Hof J. Studies on the relationships between cell population and growth kinetics of root meristem // *Exp. Cell Res.* 1967. V. 46. P. 335–347.
- Van't Hof J., Sparrow A.H. A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time // *PNAS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1963. V. 49. P. 897–902.

Relationship of the Holoploid DNA Content with the Life Form and Duration of the Life Plant Cycle

N. F. Lunkova¹, N. V. Zhukovskaya¹, and V. B. Ivanov^{1, *}

¹*Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: ivanov_vb@mail.ru

The genome size is an important endogenous factor that determines the characteristics of plant growth and development. The holoploid DNA content (C-value) in plants varies over a very wide range. The article analyzes a new Kew Botanical Garden database on the holoploid DNA content in 10 770 species of angiosperms (6633 species of dicots and 4006 species of monocots), which exceeds the previous releases of this database (London, GB). Clear differences in the holoploid content of DNA between different life forms are shown, and correlations between the C-values and other processes, especially life cycle rates, are provided. These correlations are not unambiguous and depend on a complex combination of different factors, such as origin, climatic conditions, etc.

Keywords: holoploid DNA content, life form, monocot, dicot, annuals, perennials, growth, development

УДК 575:581.143.6:582.632.1

МОРФОГЕНЕЗ РАССЕЧЕННОГО ЛИСТА БЕРЕЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*© 2020 г. О. С. Машкина^{a, b, *}, Т. М. Табацкая^a^aФГБУ Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии,
ул. Ломоносова, 105, Воронеж, 394087 Россия^bВоронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394006 Россия

*e-mail: mashkinaos@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2020 г.

После доработки 27.05.2020 г.

Принята к публикации 01.06.2020 г.

Далекарлийская береза (*Betula pendula* f. '*dalecarlica*') является разновидностью березы повислой (*B. pendula*) и имеет рассеченные листья. Исследована возможная природа нарушения морфогенеза листа (переход от рассеченной формы листа к нормальному цельному) у одного из 8-ми клонов березы далекарлийской в процессе культивирования *in vitro*. Кариологический анализ выявил у клона-ревертанта более высокую (по сравнению с клоном с рассеченными листьями) степень компактизации хроматина метафазных хромосом. Высказывается предположение, что реверсия к дикому типу имеет эпигенетическую природу. На это указывает выраженная реакция (появление листьев с рассечением) эксплантов клона-ревертанта на воздействие эпимутагена 5-азациитидина (оказывающего деметилирующее влияние на ДНК), существенное увеличение (в 6 раз) доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза. Предполагается, что изменение гормонального статуса клетки (при введении эксплантов в культуру *in vitro*), уровня метилирования ДНК и степени компактизации хроматина могли изменить характер экспрессии регуляторных генов в апексе побега (в том числе, привести к репрессии транскрипции ключевых гомеобоксных *KNOX1* – генов) и реверсии листа к дикому типу. Причем, индуцированное условиями культивирования *in vitro* “эпигенетическое молчание” достаточно стабильно и долговременно: наблюдается на протяжении 19 лет клонального микроразмножения на питательных средах без гормонов, а также сохраняется после высадки микрорастений в теплицу (*ex vitro*). Культивируемые *in vitro* клоны березы далекарлийской, контрастные по стабильности проявления признака рассеченности, являются перспективной моделью для дальнейшего изучения генетики морфогенеза листа, механизмов эпигенетической изменчивости.

Ключевые слова: *Betula pendula* f. '*dalecarlica*', клональное микроразмножение, *in vitro*, морфогенез рассеченного листа, кариологический анализ, эпигенетическая изменчивость

DOI: 10.31857/S0475145020060051

ВВЕДЕНИЕ

Формирование листа – сложный генетически детерминированный процесс, важную роль в регуляции которого играют фитогормоны, различные транскрипционные (ТФ) и средовые факторы (Ежова, 2007; Лутова и др., 2010; Kawamura et al., 2010; DeMason, Villani, 2001; Bar, Ori, 2014; Chitwood, Sinha, 2016; Maugarny-Calès, Laufs, 2018; Kong et al., 2019). Изучение механизмов формирования разнообразной формы листа – одна из важных проблем биологии развития растений, поскольку фенотипическая изменчивость листовой пластинки является не только маркером видовой разнообразия, но также играет важную роль в приспособлении к окружающей среде (Корона, Васильев, 2007; Jinxiu et al., 2018). Так, рассечение цельной листовой пластинки уменьшает площадь листа, облегчает теплообмен, снижает транспирацию, что способствует сохранению вод-

ного гомеостаза и адаптации к экологическому стрессу. Рассеченные листья (имеющие глубокие надрезы, почти доходящие до главной жилки) в меньшей степени испытывают механическое повреждение от ветра (Parkhurst, Loucks, 1972; Migalina et al., 2010; Chitwood, Sinha, 2016).

Генетические и молекулярные механизмы, контролирующие морфогенез цельного листа, наиболее хорошо изучены на модельном объекте *Arabidopsis thaliana* (Bilsborough et al., 2011; Runions, Tsiantis 2017; Jinxiu et al., 2018). Контроль развития рассеченных и сложных листьев проводится в основном на видах двудольных травянистых растений – сердечнике *Cardamine hirsuta* (Canales et al., 2009), горохе *Pisum sativum* (DeMason, Villani 2001), томатах *Solanum lycopersicum* (Bar, Ori, 2014; Jinxiu et al., 2018) и других. Показано, что, несмотря на наличие общих закономерностей генетической регуляции начальных этапов развития ли-

ста, могут наблюдаться существенные видовые различия характера экспрессии одних и тех же генов ТФ, приводящие к формированию листьев различной морфологии (Janssen et al., 1998; Lutova et al., 2015; Perez-Morales et al., 2017).

Установлено, что ключевую роль в развитии рассеченного листа играют гомеобоксные (гомеодомен-содержащие) *KNOX1*-гены (*KNOTTED1-LIKE HOMEOBOX*). Эти гены кодируют транскрипционные факторы, поддерживающие популяцию стволовых клеток в побеговой апикальной меристеме (ПАМ), которые генерируют всю надземную часть сосудистых растений (в том числе морфогенез листа) (Janssen et al., 1998; Pham, Sinha, 2003; Ежова, 2007, 2008; Лутова и др., 2010; Nay, Tsiantis, 2010).

Отмечено влияние гормонального статуса клетки, а также сигналов окружающей среды (температуры, света и др.) на экспрессию гомеобоксных генов (Ежова, 2007, 2008; Лутова, Додуева, 2007; Chitwood, Sinha, 2016).

В последнее десятилетие выявлена существенная роль малых РНК (small RNA, microRNA) в развитии простого и сложного листа. Эти некодирующие молекулы РНК регулируют экспрессию генов в основном на пост-транскрипционном уровне, участвуют в их сайленсинге путем расщепления транскриптов, играют важную роль в координации сложных процессов правильного развития листа (Kidner, 2010; Pulido, Laufs, 2010; Perez-Morales et al., 2017; Silva et al., 2019).

Несмотря на значительные успехи в этой области, еще недостаточно хорошо изучены механизмы контроля морфогенеза рассеченного листа у древесных растений. Исследования, выполненные в этом направлении (в том числе на березе) немногочисленны (Гендель, 1988; Baker-Brosh, Peet, 1997; Royer, 2012; Mu et al., 2013; Bian et al., 2019). Так, результаты транскриптомного анализа листовых меристем саженцев *Betula pendula* 'Dalecarlica' с рассеченными листьями и *B. pendula* с цельными листьями, полученных методом культуры *in vitro*, показали, что транспорт и передача сигнала ауксина были изменены у 'Dalecarlica', что, по мнению авторов (Mu et al., 2013), способствовало изменению их краевой формы листьев. У березы 'Dalecarlica' выявлены гены-кандидаты, кодирующие транскрипционные факторы, участвующие в пролиферации клеток, а также синтезе и сигнальном ответе ауксина, которые, по мнению авторов (Bian et al., 2019), играют потенциальную роль в морфогенезе рассеченных листьев березы.

Отсутствуют данные о характере проявления признака "рассеченнолистности" в зависимости от генотипа растений и влияния различных сигналов окружающей среды. Для решения этих вопросов удобной экспериментальной модельной системой (в которой возможно строгое контроли-

рование условий культивирования и состава питательной среды) является культура тканей *in vitro*.

Береза далекарлийская (*Betula pendula* f. 'dalecarlica' (L.f.) Schneid.) является разновидностью березы повислой (*B. pendula* Roth) и характеризуется красивыми глубоко рассеченными листьями, благодаря которым и используется в декоративном озеленении. Ее в основном размножают вегетативным способом (прививкой), поскольку при семенном размножении потомство часто имеет обычные (цельные) листья, что связывают с рецессивным (мутантным) характером признака (Исаков и др., 2004; Ветчинникова, 2005).

Нами разработан метод клонального микро-размножения взрослых деревьев березы далекарлийской и длительного хранения в коллекции *in vitro* ее наиболее ценных форм (Табацкая, Машкина, 2020). При этом выявлена интересная особенность. В сходных условиях культивирования *in vitro* из 8-ми генотипов в процессе клонального микро-размножения, семь – сохранили признак рассеченнолистности, а один – полностью ревертировал к нормальному фенотипу (дикому типу: цельной листовой пластинке).

Целью работы явилось исследование возможной природы нарушения морфогенеза листа у березы далекарлийской при культивировании *in vitro*.

В задачи работы входило изучение влияния различных факторов, обладающих регуляторным действием (гормонов, эпимутагенов), на проявление признака "рассеченнолистности" у разных генотипов березы в культуре *in vitro*, а также оценка особенностей кариотипа клонов, контрастных по стабильности проявления признака.

Подобные исследования являются новыми для березы и важны для более полного понимания механизмов развития рассеченного листа у древесных растений, стабильности проявления систематически значимого признака в различных средах условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служило 8 клонов березы далекарлийской в культуре *in vitro*, полученные от 8 деревьев с типичными рассеченными листьями. Исходные деревья произрастают в озеленительных посадках г. Воронежа (№ 1 и № 2) и г. Мичуринска (№ 4), Главном Ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва (№ 3), Ботаническом саду Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург (№ 5, 6, 7), Семилукском лесопитомнике г. Воронежа (№ 8). Деревья № 3–7 отобраны д. б. н. Ю.Н. Исаковым.

Регенерацию растений проводили путем прямого органогенеза из одноузловых эксплантов однолетних одревесневших побегов взрослых деревьев на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), дополненной ци-

токинином 6-бензиламинопурином (6-БАП, Sigma) в концентрации 0.5–1 мг/л.

Для уменьшения вероятности возникновения соматической изменчивости укоренение микропобегов, микроразмножение растений, их длительное хранение *in vitro* осуществляли на безгормональной питательной среде MS с половинным содержанием макроэлементов (1/2 MS) по разработанной нами методике (Табацкая, Машкина, 2020). Клональное микроразмножение с целью получения посадочного материала проводили на питательной среде 1/2 MS без гормонов, дополненной активированным углем (2.0%).

В обоих случаях в питательную среду (MS или 1/2 MS) добавляли 0.7% агар (AppliChem, США), 2% сахарозу (Panreac, Испания), 5 мг/л глицин (Вектон, Россия), 10 мг/л глутамин (Acros Organics, США), 100 мг/л мезо-инозит (Panreac, Испания), 2 мг/л тиамина, 0.5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0.5 мг/л никотиновой кислоты и 0.5 мг/л пиридоксина при pH 5.7.

Растения выращивали в стандартных условиях культивирования: при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь, освещенности 2.0 клк. Интервал субкультивирования – 1 раз в 1.5–2 мес., а при долгосрочном хранении – 1 раз в 5–6 мес.

Изучали влияние цитокинина 6-БАП (1, 2 и 5 мг/л), ауксина β -индолилуксусной кислоты (ИУК, 0.5, 2 и 5 мг/л), а также эпимутагенов 5-азациитидина (5-аза, Sigma) – 2 мг/л, никотиновой кислоты (НК, витамин PP) – 2, 5 и 10 мг/л на морфогенез и проявление признака рассечения листовой пластинки.

Под эпимутагенами понимают вещества, химически модифицирующие ДНК или белки гистоны, изменяющие экспрессию генов (Малецкий, 2009), влияние которых на морфогенез листа березы в культуре *in vitro* нами было изучено впервые.

Гормоны (6-БАП, ИУК) и эпимутагены (5-аза, НК) однократно (перед автоклавированием) добавляли в питательную среду без активированного угля. Режим автоклавирования щадящий – 15 мин, 0.8 атм (117°C). Продолжительность действия агентов в каждом случае – 30 дней (1 пассаж). Для каждого клона и варианта питательной среды анализировали не менее 30–40 микрорастений.

Кариологические исследования проводили на двух клонах, контрастных по стабильности проявления признака рассеченности при культивировании *in vitro*: клоне № 1, сохраняющем в процессе микроразмножения признак и клоне № 2, ревертирующем к нормальному фенотипу (цельный лист). Молодые листья растений из распускающихся почек фиксировали в уксусном спирте (3 : 1) с предобработкой (для анализа кариотипа) 0.002-молярным раствором 8-оксихинолина при температуре $10\text{--}14^\circ\text{C}$ в течение 3 ч. Давленные препараты, окрашенные ацетогематоксилином, из-

готавливали по методике (Буторина, 1985) в нашей модификации.

Для характеристики кариотипа определяли число хромосом ($2n$) и их размеры. Учитывали абсолютную длину хромосом (мкм) и суммарную длину хромосом набора (сумма абсолютных длин всех хромосом данной пластинки, мкм). Просмотр препаратов осуществляли на световом микроскопе Микмед 6 при увеличении $40 \times 1.5 \times 10$ и $100 \times 1.5 \times 10$. Микрофотосъемку проводили с использованием цифровой камеры окуляра DCM500. Измерение хромосом осуществлялось с помощью программы Axio Vision.

Исследования проводили в течение трех лет. Для каждого клона анализировали по 10–15 препаратов, число хромосом определяли в 20–30 метафазных пластинках, измерение хромосом проводили на 15 метафазных пластинках.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ “Stadia”. Сравнение выборок осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Микросателлитный анализ образцов проводили совместно с Институтом леса НАН Беларуси (в. н. с., д. б. н. О.Ю. Барановым). Экстракцию ДНК осуществляли из молодых листьев СТАВ-методом (Doyle, Doyle, 1987). Генетическую паспортизацию образцов проводили согласно (Падутов и др., 2007) по пяти высокополиморфным ядерным SSR-локусам – L2.2, L7.8, L10.1, L52 (Kulju et al., 2004). Электрофоретический анализ и детекцию осуществляли с помощью генетического анализатора ABI Prism Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems). Анализ размера и количества ампликонов производили с помощью программного обеспечения Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфогенез листа у разных клонов березы в условиях культуры in vitro

Различия между клонами по проявлению признака рассечения листа выявлены на этапе микрокоченкования на питательной среде 1/2 MS без гормонов. Семь клонов (№ 1, № 3–8) в процессе многократного микрокоченкования регенерантов сохранили типичные для исходных деревьев рассеченные листья (рис. 1). Реверсия клона № 2 к дикому типу отмечена при переводе культур с гормональной (MS + 6-БАП 0.5–1 мг/л) на безгормональную питательную среду 1/2 MS (70% растений с цельными листьями). К концу первого года культивирования диагностирована его полная реверсия (100% культур) к нормальному фенотипу (рис. 2).

Причем, экспланты деревьев № 1, № 2 и № 3 трижды (в разные годы) вводились в культуру *in vitro*. Результат был сходным: сохранение признака рассеченности у клонов № 1 и № 3 и ревер-

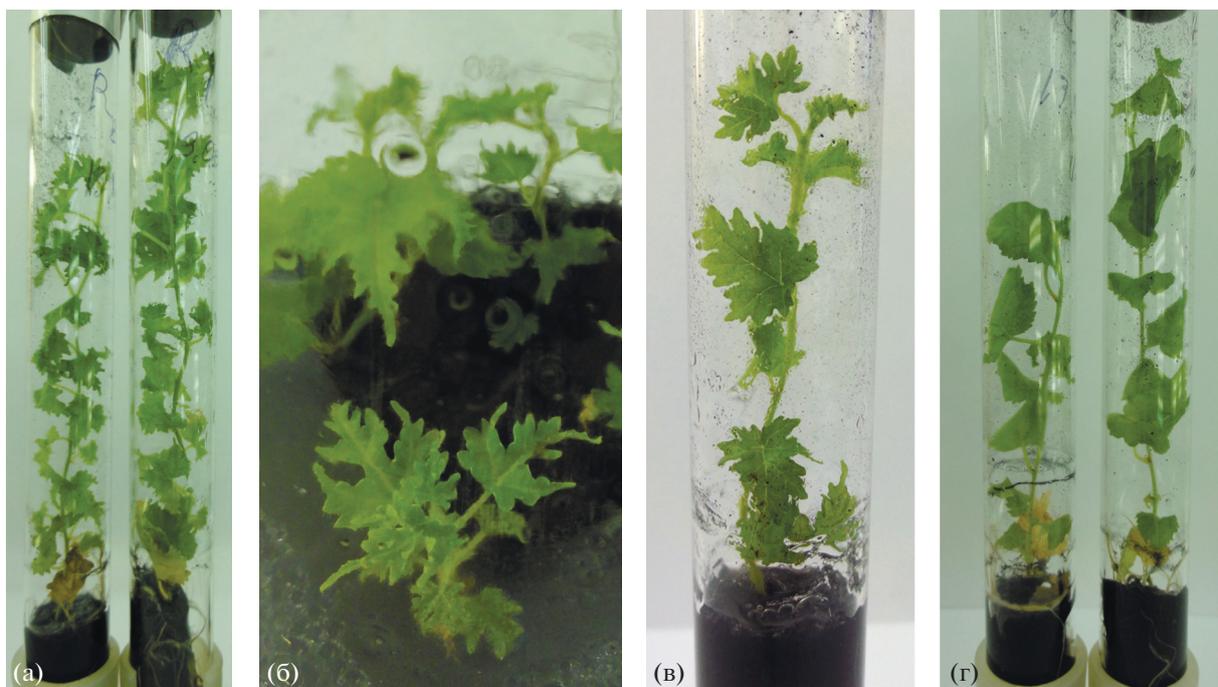


Рис. 1. Общий вид контрастных по проявлению признака рассеченности клонов далекарлийской березы в культуре *in vitro*: а, б – клон № 1, в – клон № 3, г – клон-ревертант № 2 с цельными листьями.



Рис. 2. Постепенная реверсия листьев клона рассеченнолистной березы № 2 к дикому типу (цельный лист) в процессе микрочеренкования на среде 1/2 MS без гормонов. Крайний слева – лист исходного дерева. Масштаб – 1 см.

сия к нормальному фенотипу – у клона № 2. Различия между клонами, выявленные в культуре *in vitro*, сохранялись и при их высадке в почву (рис. 3). В настоящее время клоны длительно (в течение 16–19 лет) поддерживаются в коллекции *in vitro*, стабильно сохраняя морфологические особенности листа.

Изучали влияние регуляторов роста цитокининовой (6-БАП) и ауксиновой (ИУК) природы, а также эпимутагенов (5-аза и НК) в составе питательной среды на морфогенез листа у клон-ревертанта № 2 (табл. 1). Наиболее яркая ответная реакция отмечена на воздействии ИУК в концентрации 2 мг/л. Признаки рассечения листа проявились у 40% растений (12 растений из 30) (рис. 4а). Однако, эффект был непродолжительным (наблюдал-

ся в течение 1–2 циклов субкультивирования) и постепенно исчезал при переходе на безгормональную среду. При более низком (0.5 мг/л) и более высоком (5 мг/л) содержании ИУК в питательной среде изменения морфологии листа не были отмечены.

Слабое рассечение листовой пластинки выявлено у отдельных растений того же клона при добавлении в питательную среду 5-азацитидина (4 растения из 36) (рис. 4б) или никотиновой кислоты в концентрации 10 мг/л (3 растения из 31). Причем, в варианте с 5-аза наблюдалось существенное снижение роста микропобегов (40% низкорослых растений высотой 0.5–2 см против 3–6 см в контроле), а в варианте с НК – появле-

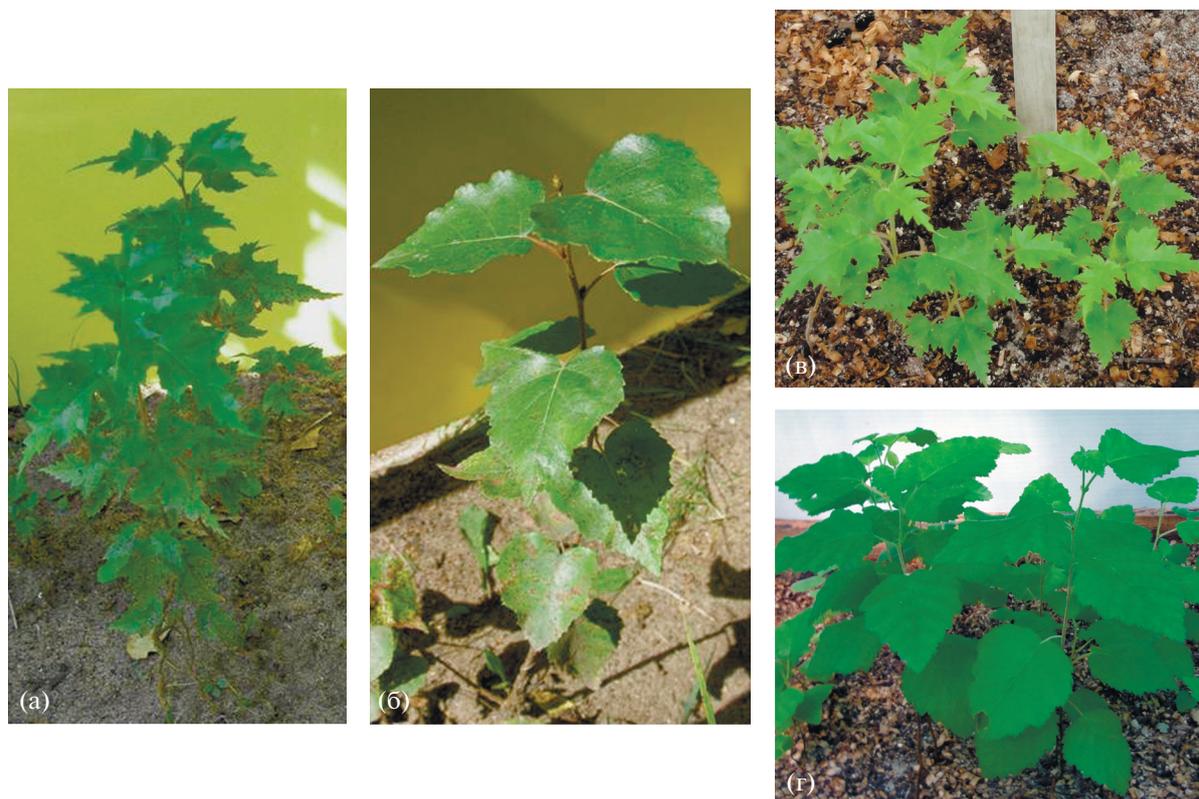


Рис. 3. Сохранение морфологии листьев растений березы клона № 1 (а, в) и клона-ревертанта № 2 (б, г), высаженных в теплицу после 1-го (а, б) и 17-ти (в, г) лет культивирования *in vitro* на питательных средах без гормонов.

ние корней с антоциановой окраской (10% культур) при 100%-ном укоренении микропобегов.

Реакция клонов березы с относительно стабильным проявлением признака рассеченности, была неоднозначной на воздействие этих же эпимутагенов. Пять клонов (№ 1, № 3, № 5, № 7 и № 8) по-прежнему сохраняли рассечение листовой пластинки. У клонов № 4 и № 6 на среде с 5-аза наблюдалось усиление признака (более глубокие надрезы) (рис. 5а) и появление низкорослых растений (до 40–50% высотой 0.5–1.5 см). У клонов № 6 и № 10 на среде с НК 10 мг/л, наоборот, происходило исчезновение рассеченности, появление ромбовидных листовых пластинок (рис. 5б).

Полученные результаты позволяют говорить о неоднозначной и специфической реакции разных клонов березы на сходные условия культивирования *in vitro*.

Микросателлитный анализ клонов березы, контрастных по проявлению признака рассеченности

Показано, что каждый из трех проанализированных клонов (№ 1, № 2 и № 3) является уникальным генотипом (табл. 2). Наличие диаллельных спектров на электрофореграмме указывает на их диплоидную природу.

Особенности кариотипа клонов березы, контрастных по проявлению признака рассеченности

Анализ плоидности микрорастений подтвердил, что оба клона (№ 1 и № 2) являются диплоидными ($2n = 28$) и содержат две ядрышкообразующие хромосомы с вторичными перетяжками, что является нормой для березы повислой (Макарова, 1989) (рис. 6).

Известно, что основу хромосомы эукариот составляет хроматин – комплекс ДНК и белков (гистонов и негистоновых). В метафазной хромосоме хроматин находится в максимально конденсированном состоянии. Имеются сведения о том, что степень конденсации хромосом (в том числе метафазных) может отражать степень компактизации хроматина (Daban, 2011; Rybaczek, 2014).

В разные годы изучения кариотипа выявлена сходная закономерность: суммарная длина хромосом диплоидного набора у клона № 1 была статистически достоверно выше (47–49 мкм) по сравнению с клоном-ревертанта № 2 (38–40 мкм) (рис. 7). Это указывает на то, что степень компактизации хроматина метафазных хромосом культивируемого *in vitro* клона № 2 выше (в 1.2–1.3 раза), чем у клона № 1. Такая же закономерность наблюдалась между соответствующими парами хромосом указанных клонов по их абсолютной длине (табл. 3).

Таблица 1. Влияние регуляторов роста и эпимутагенов (5-аза и НК) на проявление фенотипических признаков у клона ревертанта № 2 на питательной среде 1/2 MS

Добавки в питательную среду, мг/л	Доля растений с рассечением листа, %	Высота растений, см	Примечание
Контроль (без добавок)	0.0	4.9 ± 0.2	
6-БАП 1.0	0.0	3.8 ± 0.2*	
6-БАП 2.0	0.0	3.2 ± 0.1*	Каллусообразование на базальной части корней
6-БАП 5.0	0.0	3.1 ± 0.1*	
ИУК 0.5	0.0	4.0 ± 0.1*	
ИУК 2.0	40.0 (n = 30)	3.0 ± 0.1*	Каллусообразование на базальной части корней
ИУК 5.0	0.0	–	Засыхание микрочеренков
5-аза 2.0	11.1 (n = 36)	2.5 ± 0.3*	Слабое рассечение ЛП
НК 2.0	0.0	3.5 ± 0.1*	
НК 5.0	0.0	3.5 ± 0.1*	Антоциановая окраска корней (10% культур)
НК 10.0	9.7 (n = 31)	3.4 ± 0.1*	Слабое рассечение ЛП, антоциановая окраска корней (10% культур)

Растения оценивали через один месяц культивирования *in vitro*. n – число исследованных растений. * Отличия от контроля статистически значимы при P < 0.001. ЛП – листовая пластинка.

Таблица 2. Многолокусные генетические паспорта образцов клонов березы, контрастных по проявлению признака рассеченности в культуре *in vitro*

Клон	Микросателлитный локус, размер продукта (пн)			
	L2.2	L7.8	L10.1	L52
№ 1	132/138	294/304	252/256	265/265
№ 2	132/132	299/304	256/256	265/265
№ 3	132/135	298/310	256/256	262/269

У клона № 1 самая короткая (XIV-я) пара хромосом составила 1.2 мкм (с варьированием от 0.9 до 1.4 мкм), а самая длинная (I-ая пара) – 2.6 мкм (от 2.1 до 3.1 мкм). У клона № 2 эти значения составили соответственно 1.0 мкм (от 0.8 до 1.2 мкм) и 2.0 мкм (от 1.2 до 2.7 мкм). Низкие значения коэффициента вариации свидетельствуют о низком уровне изменчивости анализируемого признака.

Известно, что представители рода *Betula* L. характеризуются чрезвычайно мелкими хромосомами, вследствие чего являются трудным объектом для изучения кариотипа. Сведения о размерах хромосом ограничиваются отдельными работами (Тапер, Грант, 1973; Макарова, 1989). Согласно Тапер (Тапер, Грант, 1973) суммарная длина хромосом диплоидных видов березы (в том числе, *B. pendula* Roth) варьирует от 23.3 до 29.5 мкм; триплоидного гибрида (2n = 42) – 46.1 мкм, тетраплоидного вида березы бумажной (*Betula papyrifera* var. *subcordata* (Rydberg) Sargent) – 75.4 мкм. В нашем случае клон-ревертант № 2 по суммарной длине хромосом ближе к диплоидной березе повислой с нормальными цельными листьями, чем клон № 1 с рассеченными листовыми пластинками.

У клона-ревертанта № 2 отмечено существенное увеличение (в 6 раз – 20.5% против 3.5% у клона № 1) доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза (рис. 8). Как известно, в норме ядрышки исчезают в конце профазы, что сопряжено с приостановкой синтеза рРНК. Появление остаточных ядрышек в метафазе и анафазе митоза рассматривают как проявление эпигенетической изменчивости. Изменение генетического материала при этом не происходит, но наблюдаемый пуффинг конденсированных хромосом является цитологическим проявлением активности генов рРНК, обычно ингибированной на этих стадиях (Буторина, Тиен, 2008).

ОБСУЖДЕНИЕ

Принято считать, что при клональном микро-размножении полностью сохраняются генетические особенности исходного растения. Это подтверждают и исследования по микро-размножению *Betula pendula* Roth ‘*Dalecarlica*’ с использованием меристемных и каллусных культур (Илев et al., 2010; Zhang et al., 2018).

Тем не менее, в процессе культивирования клеток и тканей в условиях *in vitro* нередко возни-

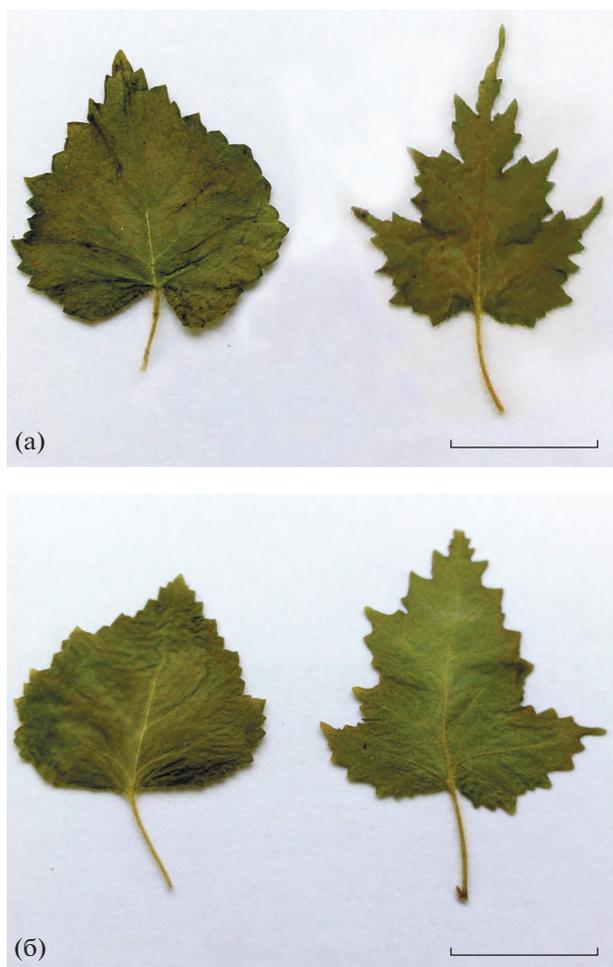


Рис. 4. Появление листьев с рассечением у клона-ревертанта № 2 (имеющего цельный лист – слева) под действием ИУК 2 мг/л (а) и 5-аза 2 мг/л (б).

кает соматическая изменчивость, нарушающая единообразие клонов. Она может быть обусловлена генотипом растения-донора, условиями и длительностью культивирования *in vitro* и другими причинами. Показано, что в ходе длительного субкультивирования может накапливаться генетическая изменчивость клеток и тканей, особенно если присутствует стадия каллусообразования (Smykal et al., 2007; Mashkina et al., 2011). Отмечено, что даже оптимальный уровень растительных гормонов при длительном культивировании часто приводит к генетической и эпигенетической изменчивости растений (Smykal et al., 2007). Следует отметить, что в нашем случае различия между 8 изученными клонами березы по проявлению признака рассечения листа проявились в сходных условиях культивирования *in vitro*.

Известно, что морфогенез рассеченного листа контролируется группой координировано функционирующих генов, ключевую роль в котором играют гомеобоксные *KNOXI*-гены. У видов растений,

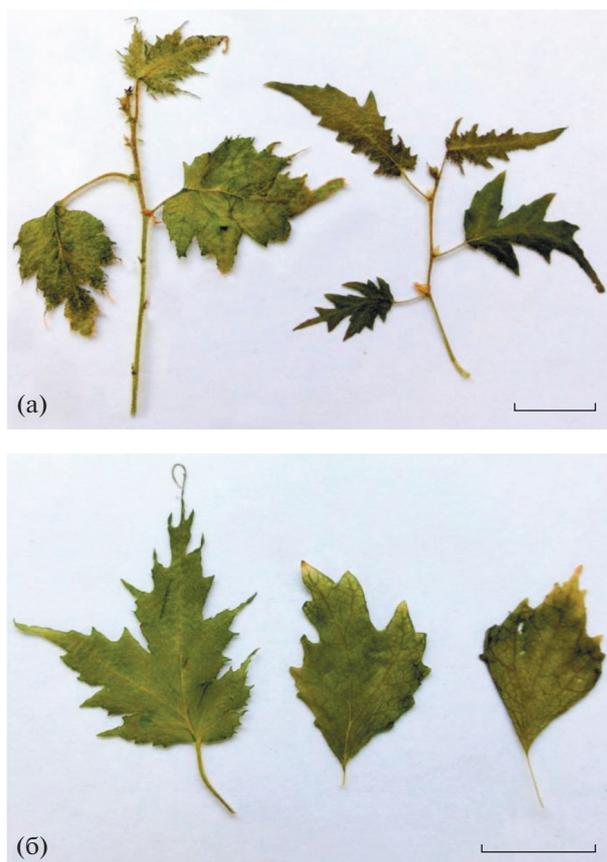


Рис. 5. Изменение морфологии листа у клона березы № 6 (исходные листья на каждой фотографии слева) под действием 5-аза – более глубокое рассечение (а) и НК 10 мг/л – исчезновение рассеченности, появление ромбовидных листьев (б).

имеющих простые цельные листья, экспрессия *KNOXI*-генов, выключенная в участках инициации листового примордия, не возобновляется на последующих стадиях его развития. При формировании рассеченного листа происходит возобновление экспрессии (эктопическая экспрессия) *KNOXI*-генов в нескольких участках по краю листовой пластинки (Janssen, 1998; Ежова, 2007, 2008; Лутова и др., 2010; Hay, Tsiantis, 2010; Lutova et al., 2015). Считают, что экспрессия *KNOXI*-генов способствует накоплению белка *PIN1* (*pinformed*), что приводит к локальному увеличению содержания ауксина на периферии ПАМ. Ауксины стимулируют экспрессию гена *ANT* (*AINTEGUMENTA*), играющего основную роль в пролиферации клеток листового примордия и росте лопасти (Barkoulas et al., 2007; Лутова и др., 2010; Kong et al., 2019). Гены *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*), экспрессия которых регулируется микроРНК miRNA164, определяют границу лопасти (Barkoulas et al., 2007; Лутова и др., 2010). Повышение

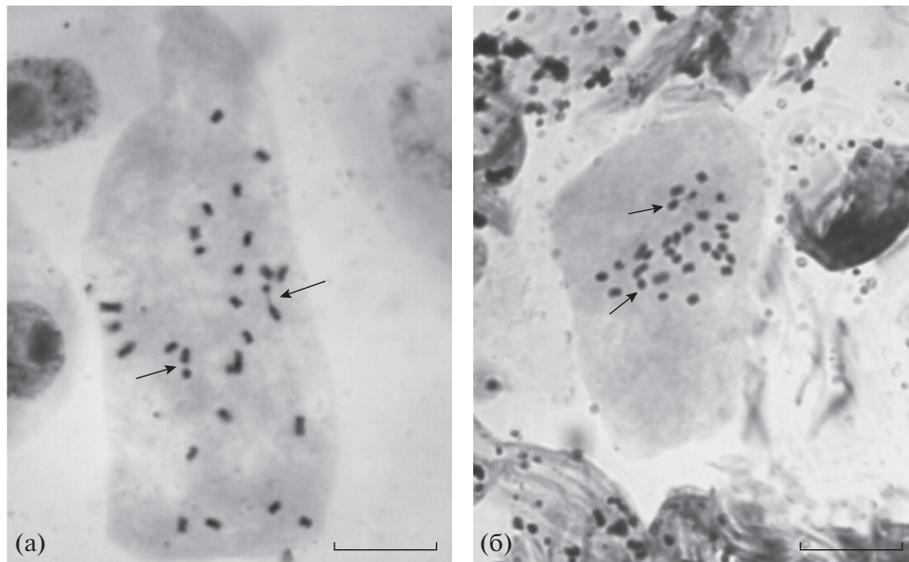


Рис. 6. Метафазные пластинки с диплоидным числом хромосом ($2n = 28$) у микрорастений клона № 1 (а) и клона № 2 (б) березы далекарлийской. Стрелками обозначены две ядрышкообразующие хромосомы. Масштаб 10 мкм.

уровня экспрессии гена *CUC3* (негативный регулятор “усложнения” листа) приводит к слиянию лопастей и развитию листовых пластинок без рассечения (Лутова и др., 2010).

KNOX1-гены, играющие важную роль в регуляции развития и усложнении структуры листа, являются эволюционно древними и высоко консервативными (Pham, Sinha, 2003; Лутова, 2010; Lutova et al., 2015). Так, например, простые листья одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Web.) становились сильно рассеченными при его трансформации *KNOX1*-генами ячменя (*Hordeum vulgare* L.) (Muller et al., 2006). Многочисленными примерами показано, что изменение характера

экспрессии указанных регуляторных генов в апексе побега приводит к изменению морфологии листа. Так, у трансгенных растений сердечника *Cardamine hirsuta* (в норме имеющего рассеченные листья) со сниженной экспрессией одного из *KNOX1*-генов, листья становились цельными (Hau, Tsiantis, 2010). Установлена важная роль ауксина в морфогенезе листа, формировании его краевой формы (цельные, зубчатые, лопастные, рассеченные) (Wang et al., 2005; Bilsborough, 2011; Jinxiu et al., 2018; Kong et al., 2019).

Выявленные нами различия между клонами березы ‘*Dalecarlica*’ по характеру проявления признака рассечения листа в условиях *in vitro* могут быть обусловлены специфической реакцией разных генотипов на сходные условия культивирования (в частности, гормональный состав питательной среды). В условиях проведенного эксперимента ревертирующий к норме клон березы № 2 проявил себя как гормончувствительный генотип. Культивирование первичных эксплантов (при их введении в условия *in vitro*) на питательной среде с цитокинином 6-БАП (0.5–1 мг/л) могло изменить эндогенный баланс гормонов в соматической ткани, что, в свою очередь, повлияло на характер экспрессии *KNOX1*-генов (вызвало их сайленсинг) и морфогенез листа (привело к супрессии мутантного морфотипа “рассеченный лист”). Ранее нами было установлено более высокое содержание регуляторов роста индольной (ауксины) и фенольной природы в побегах ревертанта № 2 по сравнению с растениями клонов № 1 и № 3 со стабильным проявлением признака рассеченности в культуре *in vitro* (Исаков и др., 2004; Самсонова и др., 2010). Косвенным показателем изменения характера экспрессии генов (в частности, генов рРНК), повышения мета-

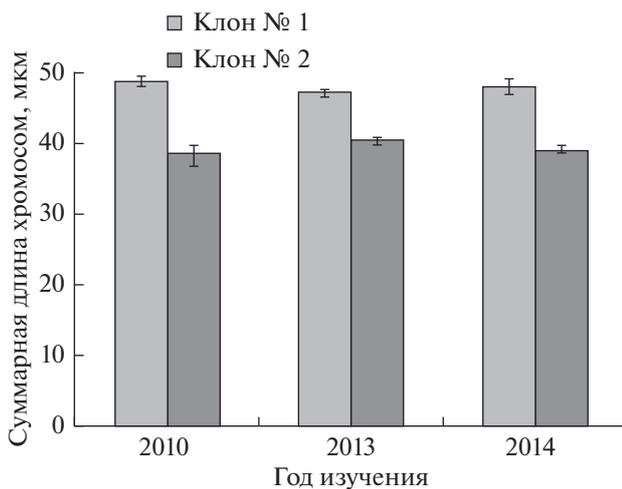


Рис. 7. Суммарная длина хромосом диплоидного набора клонов березы, контрастных по стабильности проявления признака разрезности в культуре *in vitro*. Различия между клонами № 1 и № 2 в разные годы достоверны при $p < 0.001$.

Таблица 3. Размеры хромосом диплоидного набора клонов березы, контрастных по проявлению признака расчлененности в культуре *in vitro*

Номер пары	Клон № 1		Клон № 2	
	абсолютная длина хромосом, мкм	CV, %	абсолютная длина хромосом, мкм	CV, %
I	2.6 ± 0.05	10.7	2.0 ± 0.05	13.4
II	2.2 ± 0.04	10.2	1.7 ± 0.04	13.2
III	2.0 ± 0.03	9.4	1.6 ± 0.03	11.1
IV	1.8 ± 0.03	8.6	1.5 ± 0.03	10.4
V–VII	1.7 ± 0.02	7.4	1.4 ± 0.03	9.8
VIII–IX	1.6 ± 0.02	6.9	1.3 ± 0.02	9.3
X–XI	1.5 ± 0.01	6.3	1.2 ± 0.02	8.6
XII	1.4 ± 0.02	10.2	1.2 ± 0.02	8.0
XIII	1.3 ± 0.02	10.3	1.1 ± 0.01	7.4
XIV	1.2 ± 0.02	10.1	1.0 ± 0.02	9.4
Суммарная длина хромосом, мкм	47.9 ± 0.8	6.9	39.2 ± 1.0	9.8

Представлены средние значения за 3 года исследования. Различия между клонами № 1 и № 2 по абсолютной и суммарной длине хромосом статистически значимы при $P < 0.001$.

большинством клеток листовой меристемы клона № 2 является существенное увеличение (по сравнению с клоном № 1) доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза (рис. 8).

Специфическая реакция (гормончувствительность) генотипа № 2, по-видимому, проявлялась и на воздействие ауксина ИУК в концентрации 2 мг/л. У клона-ревертанта с нормальными цельными листьями наблюдалось частичное (у 40% растений клона) восстановление исходного фенотипа “расчлененный лист” (табл. 1). У остальных клонов березы в тех же условиях культивирования изменений морфологии листа не отмечено.

Переход от расчлененной формы листа к дикому типу (цельный лист) и обратно в условиях культуры *in vitro* может осуществляться с помощью эпигенетических механизмов как результат взаимодействия генотип-среда. В этом случае в ходе адаптации генотипа к изменяющимся условиям среды (изолирование экспланта от исходного дерева, его введение в культуру *in vitro*, субкультивирование с использованием гормональных, а затем безгормональных питательных сред) могут происходить существенные изменения экспрессии генов (в том числе ключевых генов-регуляторов). Известно, что неактивное (или, наоборот, активное) состояние генов может стабильно на-

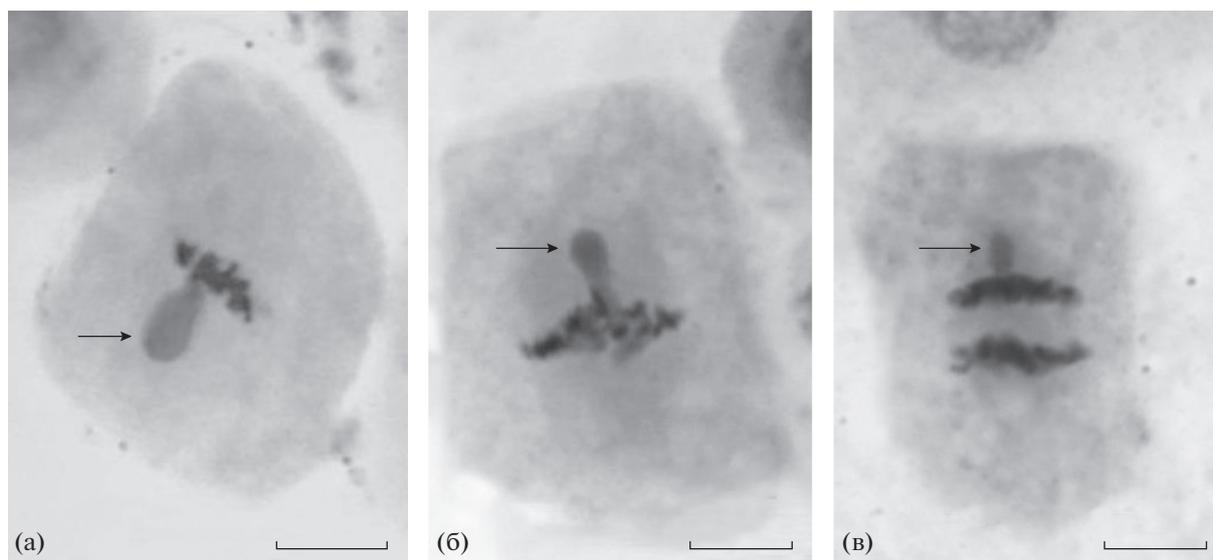


Рис. 8. Клетки с остаточными ядрышками (обозначены стрелками) в метафазе (а, б) и анафазе (в) митоза у клона-ревертанта № 2 березы далекарлийской. Масштаб 10 мкм.

следоваться в клеточных поколениях в ходе митотических делений и неограниченно долго сохраняться при вегетативном размножении (Ежова, 2008; Лутова, 2010; Lebedeva et al., 2017).

Результаты наших кариологических исследований указывают на более высокую степень компактизации хроматина метафазных хромосом клона-ревертанта № 2 в условиях *in vitro* по сравнению с клоном № 1 с рассеченными листьями (рис. 7, табл. 3), что в свою очередь, явилось одной из возможных причин подавления транскрипционной активности *KNOX1*-генов. В литературных источниках отмечается влияние уровня компактизации хроматина на экспрессию гомеобоксных генов (Pham, Sinha, 2003; Ежова и др., 2008; Лутова и др., 2010). Изменение структуры хроматина может происходить вследствие химической модификации ДНК и гистонов. Характер модификации гистонов служит эпигенетической меткой для присоединения других белков, осуществляющих ремоделирование хроматина (преобразования, ведущего к изменению структуры нуклеосом и плотности их расположения на ДНК). Компактная упаковка хроматина снижает доступность участков связывания регуляторных белков, затрудняя процесс транскрипции. Ключевыми для регуляции экспрессии генов являются метилирование и ацетилирование лизинового остатков гистона H3 (Lebedeva et al., 2017). На модельных объектах продемонстрировано, что триметилированный H3K27 встречается в транскрипционно неактивных участках хроматина и играет важную роль в регуляции генов, контролирующего развитие организма (в том числе, морфогенез листа) (Zhang et al., 2007; He et al., 2012; Lebedeva et al., 2017).

Метилирование ДНК в генах (в том числе в их промоторах) обычно ассоциировано с подавлением транскрипции (Zilberman et al., 2007), поскольку приводит к более плотной упаковке хроматина и невозможности присоединения в этом районе ДНК транскрипционного комплекса (Razin, 1998).

Показано, что эпигенетическая репрессия генов *KNOX* происходит с участием транскрипционных факторов ASYMMETRIC LEAF 1 (AS1), ASYMMETRIC LEAF 2 (AS2), белков группы CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN), POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX (PRC) и других (Лутова и др., 2010). SET домены CLF и SWN обладают активностью гистонметилтрансферазы, которая облегчает поддержание сайленсинга экспрессии целевого гена в течение нескольких клеточных делений (Hay, Tsians, 2010). Репрессивный комплекс PRC связывается с метилированными гистонами, что приводит к подавлению транскрипции генов *KNOX* (Xu, Shen, 2008). Для репрессии транскрипции генов *KNOX* в примордии листа также необходим фактор ремоделинга хроматина HIRA, контролирующей образование гетерохроматина (Lutova et al., 2015).

На эпигенетическую природу наблюдаемых изменений у клона № 2, указывают и наши эксперименты по использованию эпимутагена 5-азациитидина, при добавлении которого в питательную среду у отдельных растений ревертанта (имеющего цельный лист) наблюдалось формирование листьев с слабым рассечением (табл. 1). Известно, что эпимутаген 5-азациитидин оказывает деметилирующее влияние на ДНК (Ванюшин, 2013; Малецкий, 2009). Он встраивается в молекулу ДНК при репликации и ковалентно связывает метилтрансферазы, которые обеспечивают процесс метилирования.

Можно предположить, что добавление в питательную среду 5-аза обеспечило восстановление исходного статуса метилирования ДНК в клетках листовой меристемы клона № 2, что, в свою очередь, привело к снижению уровня компактизации хроматина, индуцировало возобновление экспрессии группы координировано функционирующих регуляторных генов (в том числе, *KNOX1*-генов) и появление листовых пластинок с признаками рассечения. Однако, наблюдаемый эффект был непродолжительным и исчезал при исключении деметилирующего агента из питательной среды.

Слабое рассечение листа у клона № 2 наблюдалось и при воздействии никотиновой кислоты (10 мг/л), которую также относят к числу эпимутагенов. В опытах с мягкой пшеницей было продемонстрировано, что обработка прорастающих семян никотиновой кислотой природного происхождения индуцировала длительно наследуемые (в течение 57 поколений) эпигенетические изменения (Богданова, 2003). Это проявлялось в изменении ряда морфофизиологических признаков, появлении высокорослых и продуктивных растений, устойчивых к экстремальным воздействиям окружающей среды. У измененных растений (названных Генотроф 1) выявлено повышенное (по сравнению с исходным сортом) содержание ядерной ДНК и РНК (что автор объясняет амплификацией генов под действием НК), измененный спектр и активность эндогенных регуляторов роста.

По всей видимости, именно индивидуальные (генотипические и физиолого-биохимические) особенности клонов березы с относительно стабильным проявлением признака рассеченности определили неоднозначность их реакции на экзогенное воздействие этих же эпимутагенов (рис. 5а, 5б). Отмеченные изменения, по-видимому, также имеют эпигенетическую природу и исчезают при исключении 5-аза и НК из среды.

Таким образом, выявленный нами (у одного из 8-ми клонов березы далекарлийской) феномен изменения морфогенеза листа в процессе культивирования *in vitro* (переход от рассеченной формы листа к дикому типу — цельный лист) по всей видимости, имеет эпигенетическую природу. На это указывают: выраженная реакция (появление ли-

ствьев с рассечением) эксплантов на воздействие 5-азациитидина (который изменяя уровень метилирования ДНК, по-видимому, приводит к разрывлению хроматина и активации целой группы регуляторных генов, в том числе ключевых *KNOX1*-генов); положительный отклик на никотиновую кислоту; наличие остаточных ядрышек в митозе клеток листовой меристемы. Результаты исследований показали, что данный генотип (клон № 2) характеризуется также повышенной гормональностью к воздействию регуляторов роста цитокининовой (6-БАП) и ауксиновой (ИУК) природы.

Мы предполагаем, что изменение гормонального статуса клетки (при введении эксплантов в культуру *in vitro* и начальных этапах культивирования), уровня метилирования ДНК и степени компактизации хроматина могли привести к подавлению экспрессии гомеобоксных *KNOX1*-генов (кодирующих транскрипционные факторы, влияющих на морфогенез листа) и реверсии к дикому типу (цельному листу). Причем, индуцированное условиями культивирования *in vitro* “эпигенетическое молчание” достаточно стабильно и долговременно, передается по клеточным поколениям в процессе клонального микроразмножения (наблюдается на протяжении 16–19 лет культивирования *in vitro*), а также сохраняется после высадки микрорастений в теплицу (*ex vitro*).

Таким образом, согласно литературным, а также нашим экспериментальным данным, природа рассеченности листа у березы может иметь как мутационную, так и эпигенетическую природу. Исчезновение этого признака у далекарлийской березы при семенном размножении связывают с рецессивной мутацией, вызывающей рассеченность листа (Исаков и др., 2004). В тоже время, исчезновение проявления признаков характерно и для генетических химер, у которых мутация затрагивает клетки только определенных слоев апикальной меристемы. В частности, если мутация произошла в клетках слоя L1 (из которых образуется эпидермис побега) или L3 (из которых формируются внутренние ткани листа и стебля), то признак исчезнет у половых потомков, поскольку у двудольных растений гаметы формируются из слоя L2 (Pogany, Lineberger, 1990; Лутова и др., 2010). У вегетативно размножаемых растений химеры (в том числе, периклиналиные) встречаются довольно часто. При черенковании (в том числе, в культуре *in vitro*) может наблюдаться их разрушение (Pogany, Lineberger, 1990; Лутова и др., 2010).

Предполагают, что рассеченные листья в эволюционном плане являются более молодыми (по сравнению с простыми цельными листьями) (Тахтаджян, 1964). Возможно поэтому рассеченнолистная береза далекарлийская (являющаяся формой березы повислой с цельными листьями) сильнее (хотя и по-разному для разных генотипов) реагирует на сигналы внешней и внутренней

среды. Реализация же разнообразных эпигенетических механизмов регуляции генов, по-видимому, обуславливает высокую (хотя и неоднозначную) пластичность генотипа к выбору программы развития листа в различных условиях культивирования *in vitro*.

Мы показали, что культивируемые *in vitro* клоны березы далекарлийской, контрастные по стабильности проявления признака рассеченнолистности, являются перспективной моделью для дальнейшего изучения генетики морфогенеза листа древесных растений, механизмов эпигенетической изменчивости. Подобные исследования также имеют и прикладное значение, поскольку генотипы со стабильным проявлением признака рассеченнолистности в условиях культуры *in vitro* представляют интерес для клонального микроразмножения с целью получения посадочного материала с гарантированным сохранением морфотипа с декоративными листьями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках тем государственных заданий № 114040740046, № АААА-А17-117041810337-8 и № АААА-А20-120012890092-6 Федерального агентства лесного хозяйства.

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 данное исследование и подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богданова Е.Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. 2003. Т. 39. № 9. С. 1221–1227.
- Буторина А.К. Цитогенетика хозяйственно-ценных форм карельской березы // Генетика. 1985. Т. XXI. № 7. С. 1192–1198.
- Буторина А.К., Тиен Д.Н. Ритмы суточной митотической активности у золотистой фасоли *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek // Цитология. 2008. Т. 50. № 8. С. 729–733.
- Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 805–832.
- Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 2005. 269 с.
- Гендельс Т.В. Особенности морфогенеза листа двудольных // Ботанический журнал. 1988. Т. 73. № 11. С. 1554–1559.

- Ежова Т.А. Генетический контроль ранних этапов развития листа // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 434–445.
- Ежова Т.А. Генетическая и эпигенетическая регуляция морфогенеза листа // Вестник ТвГУ, серия “Биология и экология”. 2008. № 9. С. 66–75.
- Исаков Ю.Н., Табацкая Т.М., Машкина О.С. и др. Генетико-селекционные особенности рассеченнолистной формы березы повислой // Генетика в XXI в.: современное состояние и перспективы развития. М.: УРСС, 2004. Т. 1. С. 184.
- Корона В.В., Васильев А.Г. Строение и изменчивость листьев растений: Основы модульной теории. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 280 с.
- Лутова Л.А., Додуева И.Е. Роль меристемоспецифичных генов растений в формировании генетических опухолей // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 420–433.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е. и др. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 432 с.
- Макарова Т.П. Сравнительный кариологический анализ березы повислой и березы пушистой центральной части Южной тайги: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1989. 19 с.
- Малецкий С.И. Семантическая структура понятий “наследственность” и “эволюция” // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 820–852.
- Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воронаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Самсонова А.Е., Табацкая Т.М., Машкина О.С. и др. Фитогормоны и стабильность проявления признака разрезнолистности березы повислой при культивировании *in vitro* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж: ООО “Центрально-Черноземное книжное издательство”, 2010. Вып. 12. С. 200–207.
- Табацкая Т.М., Машкина О.С. Опыт долговременного хранения коллекции ценных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред // Лесоведение. 2020. № 2. С. 147–161.
- Техтаджян А.Л. Основы эволюционной морфологии покрытосеменных М.—Л.: Наука, 1964. 236 с.
- Bar M., Ori N. Leaf development and morphogenesis // Development. 2014. V. 141. № 22. P. 4219–4230.
- Baker-Brosh K.F., Peet R.K. The ecological significance of lobed and toothed leaves in temperate forest trees // Ecology. 1997. V. 78. № 4. P. 1250–1255.
- Barkoulas M., Galinha C., Grigg S.P. et al. From genes to shape: regulatory interactions in leaf development // Curr. Opin. Plant Biol. 2007. V. 10. № 6. P. 660–666.
- Bian X., Qu C., Zhang M. et al. Transcriptome analysis provides new insights into leaf shape variation in birch // Trees. 2019. V. 33, № 5. P. 1265–1281.
- Bilsborough G. D., Runions A., Barkoulas M. et al. Model for the regulation of Arabidopsis thaliana leaf margin development // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. V. 108. № 8. P. 3424–3429.
- Canales C., Barkoulas M., Galinha C. et al. Weeds of change: Cardamine hirsuta as a new model system for studying dissected leaf development // J. Plant Res. 2009. V. 123. № 1. P. 25–33.
- Chitwood D.H., Sinha N.R. Evolutionary and environmental forces sculpting leaf development // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 7. P. 297–306.
- Daban J.R. Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure // Micron. 2011. V. 42. № 8. P. 733–750.
- DeMason D.A., Villani P.J. Genetic control of leaf development in pea (*Pisum sativum*) // International Journal of Plant Sciences. 2001. V. 162. № 3. P. 493–511.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. № 19. P. 11–15.
- Hay A., Tsiantis M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity // Development. 2010. V. 137. № 19. P. 3153–3165.
- He C., Chen X., Huang H. et al. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured Arabidopsis tissues // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 8. P. e1002911.
- Iliev I., Scaltsoyianes A., Tsaktsira M. et al. Micropropagation of *Betula pendula* Roth cultivars by adventitious shoot induction from leaf callus // Acta Horticulturae. 2010. № 885. P. 161–173.
- Janssen B.J., Williams A., Chen J.J. et al. Isolation and characterization of two knotted-like homeobox genes from tomato // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. Issue 3. P. 417–425.
- Jinxu Ke, Duo Chen, Yanping Guo. Designing leaf marginal shapes: Regulatory mechanisms of leaf serration or dissection // Biodiversity Science. 2018. V. 26. № 9. P. 988–997.
- Kawamura E., Horiguchi G., Tsukaya H. Mechanisms of leaf tooth formation in Arabidopsis // Plant J. 2010. V. 62. № 3. P. 429–441.
- Kidner C.A. The many roles of small RNAs in leaf development // J. Genet Genomics. 2010. V. 37. № 1. P. 13–21.
- Kong X., Huang G., Xiong Y. et al. IBRS regulates leaf serrations development via modulation of the expression of PIN1 // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 18. P. 4429.
- Kulju K.K.M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) // Molecular Ecology Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 471–473.
- Lebedeva M.A., Tvorogova V.E., Tikhodeyev O.N. Epigenetic mechanisms and their role in plant development // Russ. J. Genet. 2017. V. 53. № 10. P. 1057–1071.
- Lutova L.A., Dodueva I.E., Lebedeva M.A. et al. Transcription factors in developmental genetics and the evolution of higher plants // Russ. J. Genet. 2015. V. 51. № 5. P. 449–466.
- Mashkina O.S., Butorina A.K., Tabatskaya T.M. Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) as a model for studying genetic and epigenetic variation related to the formation of patterned wood // Russ. J. Genet. 2011. V. 47. № 8. P. 951–957.
- Maugarny-Calès A., Laufs P. Getting leaves into shape: A molecular, cellular, environmental and evolutionary view // Development. 2018. V. 145. № 13. P. 1–16.
- Migalina S.V., Ivanova L.A., Makhnev A.K. Changes of leaf morphology in *Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh. along a zonal-climatic transect in the Urals and Western Siberia // Russ. J. Ecol. 2010. № 41. P. 293–301.
- Mu H., Lin L., Liu G. et al. Transcriptomic analysis of incised leaf-shape determination in birch // Gene. 2013. V. 531. Issue 2. P. 263–269.
- Muller K., He X., Fischer R. et al. Constitutive knox1 gene expression in dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) changes leaf morphology from simple to compound // Planta. 2006. V. 224. P. 1023–1027.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 13. P. 473–497.

- Parkhurst D. F., Loucks O.L. Optimal leaf size in relation to environment // *Journal of Ecology*. 1972. V. 60. № 2. P. 505–537.
- Perez-Morales M.B., Covarrubias A.A., Reyes J.L. The key role of small RNAs in the making of a leaf // *Ind. J. Plant Physiol.* 2017. V. 22. № 4. P. 393–400.
- Pham T., Sinha N. Role of Knox genes in shoot development of *Welwitschia mirabilis* // *J. Plant Sci.* 2003. V. 164. P. 333–343.
- Pogany M.F., Lineberger R.D. Phenotypic variation during micropropagation of the chimera *Rhododendron* ‘President Roosevelt’ // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1990. № 21. P. 201–209.
- Pulido A., Laufs P. Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development // *J. Experimental Botany*. 2010. V. 61. Issue 5. P. 1277–1291.
- Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection // *The EMBO J.* 1998. V. 17. № 17. P. 4905–4908.
- Royer D.L. Leaf shape responds to temperature but not CO₂ in *Acer rubrum* // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11: e49559.
- Runions A., Tsiantis M. The shape of things to come: From typology to predictive models for leaf diversity // *Am. J. Bot.* 2017. V. 104. № 10. P. 1437–1441.
- Rybaczek D. Ultrastructural changes associated with the induction of premature chromosome condensation in *Vicia faba* root meristem cells // *Plant Cell Rep.* 2014. № 33. P. 1547–1564.
- Silva P.O., Batista D.S., Cavalcanti J.H.F. et al. Leaf heteroblasty in *Passiflora edulis* as revealed by metabolic profiling and expression analyses of the microRNAs miR156 and miR172 // *Ann. Bot.* 2019. V. 123. № 7. P. 1191–1203.
- Smykal P., Valledor L., Rodríguez R. et al. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) // *Plant Cell Reports*. 2007. V. 26. № 11. P. 1985–1998.
- Taper L.J., Grant W. F. The relationship between chromosome size and DNA content in birch (*Betula*) species // *Caryologia*. 1973. V. 26. № 2. P. 263–273.
- Wang H., Jones B., Li Z. et al. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis // *Plant Cell*. 2005. V. 17. № 10. P. 2676–2692.
- Xu L., Shen W.H. Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 24. P. 1966–1971.
- Zhang X., Clarenz O., Cokus S. et al. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 5. P. e129.
- Zhang L.-J., He J.-Y., Sun X.-M. Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Betula pendula* Roth ‘Dalecarlica’ // *Forest Research*. 2018. V. 31. № 4. P. 135–141.
- Zilberman D., Gehring M., Tran R.K. et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription // *Nature Genetics*. 2007. V. 39. № 1. P. 61–69.

Morphogenesis of a Dissected Birch Leaf *in vitro* Culture

O. S. Mashkina^{1,2,*} and T. M. Tabatskaya¹

¹All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, ul. Lomonosova 105, Voronezh, 394087 Russia

²Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia

*e-mail: mashkinaos@mail.ru

The *Betula pendula* f. ‘Dalecarlica’ is a variety of silver birch (*B. pendula*) and has dissected leaves. The possible nature of the disturbance of leaf morphogenesis (the transition from a dissected shape to a normal whole leaf) in one of the 8 clones of *Betula* ‘dalecarlica’ during *in vitro* cultivation was investigated. Karyological analysis revealed a higher degree of chromatin compaction of metaphase chromosomes in the revertant clone versus the clone with dissected leaves. Reversion to the wild type is suggested to have epigenetic nature. This is indicated by a pronounced reaction (appearance of leaves with dissection) of the explants of the revertant clone to the effect of the 5-azacytidine epimutagen (which has a demethylating effect on DNA), a significant increase (by 6 times) in the proportion of cells with residual nucleoli in the metaphase and anaphase of mitosis. It is assumed that changes in the hormonal status of the cell (when explants were introduced *in vitro* culture), the level of DNA methylation, and the degree of chromatin compaction could change the expression pattern of regulatory genes in shoot apex (including the repression of transcription of key homeobox KNOX1 genes) and leaf reversion to wild type. Moreover, the “epigenetic silence” induced by the *in vitro* conditions is quite stable and long-term: it has been observed for 19 years of clonal micropropagation using nutrient media without hormones, and it also preserves after planting microplants in the greenhouse (*ex vitro*). Cultivated *in vitro* clones of *Betula* ‘dalecarlica’, contrasting in stability manifestations of the sign of dissected leaves, are a promising model for further studying the genetics of leaf morphogenesis and mechanisms of epigenetic variability.

Keywords: *Betula pendula* f. ‘dalecarlica’, micropropagation, *in vitro*, morphogenesis of a dissected leaf, karyological analysis, epigenetic variability

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОМОТОРА ГЕНА *Pou5f1* (*Oct4*)
С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ОКРУЖЕНИЕМ© 2020 г. А. А. Кузьмин^{а, #}, В. В. Ермакова^{а, #}, Е. В. Потапенко^а,
М. Г. Острроверхова^а, Н. А. Гурьев^а, А. Н. Томили^{а, *}^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук,
Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064 Россия

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

Поступила в редакцию 06.07.2020 г.

После доработки 25.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Ген *Pou5f1* (*Oct4*) известен как центральный регулятор клеточной плюрипотентности, однако, многие аспекты, связанные с ролью его регуляторных элементов в транскрипционной активности близлежащих генов остаются практически не изученными. В настоящем исследовании мы осуществили биаллельную делецию промотора *Pou5f1* в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши, сохранив при этом плюрипотентные свойства клеток посредством внедрения 9.8-т.п.н. фрагмента гена *Pou5f1* в транс-положение. Полученные результаты подтверждают определенные ранее границы *Pou5f1*, в то время как полученные ЭСК послужат незаменимой моделью для изучения энхансерной роли промотора *Pou5f1* в регуляции транскрипционной активности окружающих его генов.

Ключевые слова: *Pou5f1*, cis-регуляторные элементы, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, CRISPR/Cas9, *Rosa26*, e-промотор

DOI: 10.31857/S0475145020060038

ВВЕДЕНИЕ

Исследования гена *Pou5f1* (*Oct4*), как основного участника формирования плюрипотентной массы клеток в процессе эмбриогенеза млекопитающих начались с конца 80-х годов прошлого века. В дальнейшем была также показана его непосредственная вовлеченность в образование колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). К настоящему моменту он известен, как ключевой регулятор плюрипотентности, регулирующий транскрипцию ассоциированных с этим состоянием генов, а также как пионер-фактор, способный репрограммировать дифференцированные клетки за счет связывания с закрытым хроматином (Nichols et al., 1998; Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014). Однако, многие аспекты, связанные с регуляцией транскрипции самого гена *Pou5f1*, равно как и ролью его регуляторных элементов в транскрипционной активности близлежащих генов остаются не в полной мере изученными.

В 2000 году Niwa с соавторами показали, что снижение или повышение уровня экспрессии *Pou5f1* более чем на 50% ведет к дифференциации клеток в направлении трофэктодермы или мезо-

дермы/первичной энтодермы, соответственно (Niwa et al., 2000). Эти результаты свидетельствовали о наличии в стволовых клетках тонких механизмов контроля экспрессии *Pou5f1*. В дальнейшем был выявлен один из таких механизмов, обеспечиваемый работой проксимального (PE) и дистального энхансера (DE) этого гена. Оказалось, что работа этих энхансеров строго зависит от стадий эмбрионального развития и условий культивирования клеток.

Как известно, плюрипотентные стволовые клетки могут находиться в двух основных состояниях — наивном и праймированном. Первое состояние соответствует клеткам раннего эпибласта до имплантации и обладает уникальными характеристиками. Например, такие клетки экспрессируют, помимо *Oct4* и *Sox2* специфичные маркеры — *Nanog*, *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*, *ESRRb*, которые отсутствуют в клетках праймированных, соответствующих позднему эпибласту имплантированного эмбриона. В свою очередь последним соответствуют маркеры *Otx2* и *Zic2*. Кроме того, каждый тип клеток зависит от метода культивирования. Например, для культивирования эпибластных стволовых клеток необходимо присутствие в среде *Fgf2* и *Activin A* (Weinberger et al., 2016). Кроме того, оказалось, что DE

[#] Эти авторы имеют одинаковый вклад в работу.

активен в наивных плюрипотентных клетках, а PE активируется в праймированных клетках (Choi et al., 2016). Таким образом, эти два элемента являются частью механизма, обеспечивающего правильную пространственно-временную регуляцию экспрессии *Pou5f1*.

По мере развития новых молекулярно-биологических методов, в том числе методов геномной инженерии, были выявлены и другие потенциальные цис-регуляторные элементы, влияющие на уровень экспрессии гена *Pou5f1*. Так, используя библиотеку гидовых РНК системы CRISPR/Cas9 был разработан метод CREST-seq, применив который, авторы обнаружили 45 CRE-элементов (цис-регуляторных элементов) для *Pou5f1*. Удаление этих областей ДНК оказывало влияние на уровень экспрессии гена *Pou5f1*. Интересно, что 17 из таких элементов представляли собой промоторы других генов и находились за пределами DE и PE (Diao et al., 2017). Такие промоторы могут представлять собой так называемые e-промоторы – регуляторные элементы, сочетающие в себе свойства как энхансеров, так и промоторов. Более того, Dao с соавторами показали, что 2–3% промоторов кодирующих генов могут проявлять энхансерную активность (Dao et al., 2017). По ряду признаков промотор *Pou5f1* может выступать в роли e-промотора, и исследование такой возможности представляет несомненный интерес ввиду локализации *Pou5f1* в локусе, высоко обогащенном генами.

Одним из таких признаков служит исследование, связывающее последовательность POU5F1 с аутоиммунными заболеваниями. Авторами соответствующей работы было показано, что полиморфизмы нуклеотидной последовательности в области промотора этого гена ассоциированы с патогенезом псориаза (Chang et al., 2007).

В настоящем исследовании мы осуществили биаллельную делецию промотора *Pou5f1*, обеспечив при этом само-поддержание ЭСК за счет внедренной в дистальное геномное расположение функциональной копии гена *Pou5f1*. Полученные таким образом ЭСК послужат удобной моделью изучения роли промотора гена *Pou5f1* в качестве e-промотора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. Для CRISPR/Cas9-опосредованного внедрения конструкций в локус *Rosa26* использовалась модифицированная плаزمида pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9, несущая в себе последовательности Cas9, гидРНК и флуоресцентный белок mCherry для селекции клеток. Последовательность гидРНК была подобрана с использованием онлайн платформы Benchling (www.benchling.com).

Клеточные линии. ЭСК мыши линии *Pou5f1^{flx/flx}*, в которых промотор и первый экзон гена *Pou5f1* фланкированы LoxP сайтами, были описаны ра-

нее (Kehler et al., 2004). В качестве фидерных клеток использовали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ), полученные из 14-дневных эмбрионов мышей.

Получение митомицин-инактивированных фибробластов и приготовление фидерного слоя. МЭФ, полученные от мышей линии C57/BL6, культивировали на 10-сантиметровых культуральных чашках (Eppendorf). По достижении 100% плотности, среду меняли на минимальный объем свежей среды, содержащей Митомицин-С (Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл. После инкубации в течение 2.5 ч клетки промывали PBS, снимали трипсином и рассеивали в концентрации $36 \times 10^3/\text{см}^2$ или хранили в жидком азоте.

Культивирование клеток. ЭСК мыши культивировали в ЭСК-среде, в состав которой входили: Knockout DMEM (Gibco), 15% эмбриональная бычья сыворотка (Sigma), 100 ед./мл пенициллин (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицин (Gibco), 2 mM L-глутамин (Gibco), заменимые аминокислоты (NEAA, Gibco), hLIF (Leukemia inhibitory factor – лейкоз-ингибирующий фактор), приготовленный в лабораторных условиях. Пересев клеток проводился с использованием 0.05% раствора трипсина-EDTA. ЭСК растили на культуральном пластике, покрытом фидерным слоем митомицин-инактивированных фибробластов. Среду меняли каждый день или через день в зависимости от плотности ЭСК.

Временная трансфекция. Временная трансфекция осуществлялась в лунках 24-луночного планшета с использованием реагента FuGene HD (Promega). За день до трансфекции клетки рассеивались в плотности $10 \times 10^3/\text{см}^2$. За час до добавления трансфекционной смеси клеткам заменяли среду на бессывороточную (OptiMEM (Gibco) с добавлением hLIF). Через 12 ч после трансфекции среду заменяли на стандартную ЭСК-среду. Еще через день клетки рассеивали на 6-см чашки и подвергали селекции на соответствующем антибиотике.

Клонирование гидовой последовательности. Гидовую последовательность клонировали в вектор pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 по сайтам BpiI. Для этого исходную плазмиду линейаризовали ферментом BpiI (Thermo Fisher Scientific), выделяли и использовали в качестве вектора. В качестве вставки использовали синтезированные олигонуклеотиды, длиной 24–25 нуклеотидов, содержащие специфическую гидовую последовательность (20–21 нуклеотидов) и короткую последовательность, соответствующую сайту рестрикции (4 нуклеотида). Два частично комплементарных олигонуклеотида смешивали в 10 мкл 1-кратного лигазного буфера, плавляли при 96°C в термостате, после чего медленно остужали до 40°C. В дальнейшем лигирование с 50–100 нг вектора проводили по стандартному протоколу.

Создание генетической конструкции для переноса локуса *Pou5f1*. Плазмиду Rosa26-GOF-2APuro получали в два этапа. Сначала, последовательность 2A-Puro (P2A-сайт, соединенный с геном устойчивости к пуромицину) встраивали в плазмиду pGOF18, содержащую 18-килобазный геномный фрагмент, охватывающий ген *Pou5f1* (Yeom et al., 1996). Встраивание производили перед стоп-кодонами, сохраняя рамку считывания. После этого, из полученной конструкции вырезали фрагмент 11 т.п.н., включающий последовательность 2A-Puro и геномную последовательность *Pou5f1* (положение $-5.4...+4.9$ т.п.н. относительно точки начала транскрипции) и встраивали в плазмиду Ai65(RCFL-tdT) (Addgene, Cat. 61577), содержащую плечи гомологии к *Rosa26*.

Геномное редактирование. Для встраивания в локус *Rosa26* при помощи CRISPR/Cas9 технологии была использована гидРНК 5'-ACTC-CAGTCTTTCTAGAAGA-3'. После котрансфекции клоны ЭСК отбирали на антибиотике пуромицине с рабочей концентрацией 1 мкг/мл. В дальнейшем отобранные колонии генотипировали методом ПЦР на наличие всех необходимых модификаций.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Иммуноцитохимическое окрашивание выполняли по стандартному лабораторному протоколу с использованием первичных антител против Oct4 (SantaCruz, C10, 1 : 500), Nanog (Bethyl a300-397a, 1 : 250), Sox2 (Invitrogen pa1094x, 1 : 250), Rex1 (Invitrogen pa5-27567, 1:200), а также Klf4 (Abcam 129473, 1 : 250). Протокол включал в себя фиксацию в 4% PFA в течении 10 мин, этапы пермеабилзации с Triton X100 (0.1%, 10 мин), блокировки в PBS с добавлением 1% БСА и 2% овечьей сыворотки. Фиксированные клетки инкубировали с первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Вторичные антитела, меченные Cy3 или Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с клетками в течение полутора часов при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве объекта исследования были выбраны ранее полученные нами ЭСК мыши, в которых промотор и первый экзон *Pou5f1* в обоих аллелях был фланкирован loxP-сайтами (*Pou5f1^{lox/flox}*) (Kehler et al., 2004).

Для создания модельной системы, в ЭСК *Pou5f1^{lox/flox}* были удалены промотор (PP) и первый экзон (ex1) обоих аллелей *Pou5f1^{lox/flox}*, для чего клетки трансфецировали плазмидой, экспрессирующей сшитую с доменами эстрогенового рецептора ERT2 Cre-рекомбиназу. Вход рекомбиназы в ядро и выщепление указанных участков запускались посредством добавления в среду ли-

ганда – тамоксифена. Продукт такого выщепления (*Pou5f1^{Δ/Δ}*) является нефункциональным аллелем (Kehler et al., 2004), что ведет к дифференцировке ЭСК. Для сохранения плюрипотентного статуса клеток, одновременно с инактивацией *Pou5f1^{lox/flox}*, в локус *Rosa26* при помощи гомологичной рекомбинации, индуцируемой системой CRISPR/Cas9 (Bressan et al., 2017), вводили последовательность гена *Pou5f1*, охватывающую экзоны и интроны гена, а также его промотор (PP), проксимальный (PE) и дистальный энхансеры (DE) (положение $-5.4...+4.9$ т.п.н. относительно точки начала транскрипции, рис. 1а), являющиеся необходимыми и достаточными элементами для тонкой регуляции его работы в раннем/позднем эпибласте. Кроме того, для отбора мутантных клонов, непосредственно перед стоп-кодонами была встроена последовательность устойчивости к пуромицину, экспрессирующаяся в составе бицистронной последовательности совместно с *Pou5f1*. Отобранные клоны генотипировали на наличие делеции по обоим аллелям, а также на наличие вставки в локус *Rosa26* (рис. 1б). Описание стратегии генотипирования флоксированных аллелей было приведено ранее (Kehler et al., 2004). Ампликон, характеризующий вставку, соответствует 1.48-т.п.н. фрагменту, амплифицирующемуся праймерами, с 5'-конца затрагивающими *Rosa26* локус левее плеча гомологии, а с 3'-конца – фрагмент встраиваемого *Pou5f1*. Суммарно, из 20 отобранных колоний, у 10 были удалены флоксированные области по обоим аллелям, и у 6 из них был подтвержден перенос локуса в *Rosa26*. Таким образом, в результате проведенных манипуляций были успешно получены 6 клонов ЭСК *Pou5f1^{Δ/Δ}; Rosa26^{Pou5f1/+}*.

Локус *Rosa26* широко используется для получения трансгенных клеточных линий, в том числе с применением системы CRISPR/Cas9. Подход, основанный на внедрении геномной последовательности *Pou5f1* в данный локус был выбран по причине необходимости получения генетически равноценных линий клеток для дальнейшего адекватного анализа и сравнения. В противном случае, из-за неопределенного количества копий при получении стабильных линий, а также из-за неизвестной геномной локализации таких инсерций, возможность сделать конкретные и всеобъемлющие выводы при сравнении линий оставалась бы спорной.

Согласно статье Karwacki-Neisius с соавторами, уменьшение уровня экспрессии *Pou5f1* может приводить к усилению плюрипотентных характеристик клеток, таких как повышенный уровень экспрессии Nanog, пониженная частота спонтанной дифференцировки и усиленное связывание белка Oct4 с энхансерами, ассоциированными с состоянием плюрипотентности (Karwacki-Neisius et al., 2013). В данном исследовании авторы получили и использовали гетерозиготную (*Pou5f1^{+/-}*)

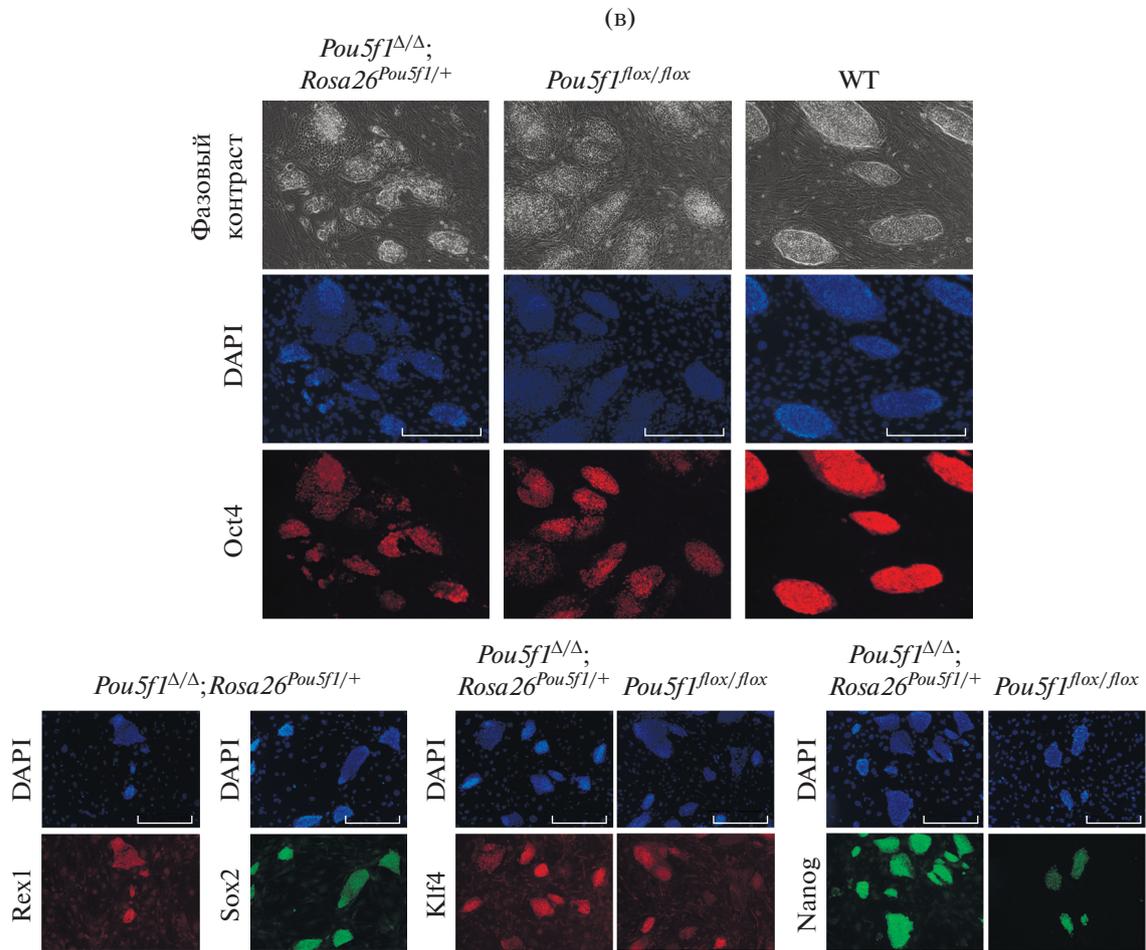
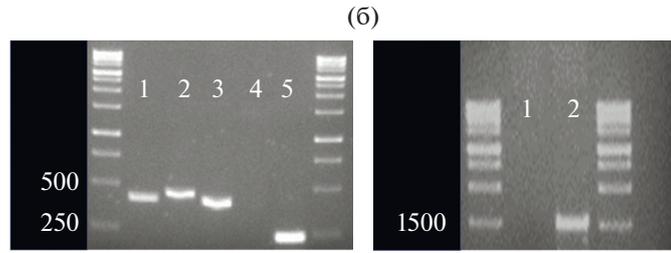
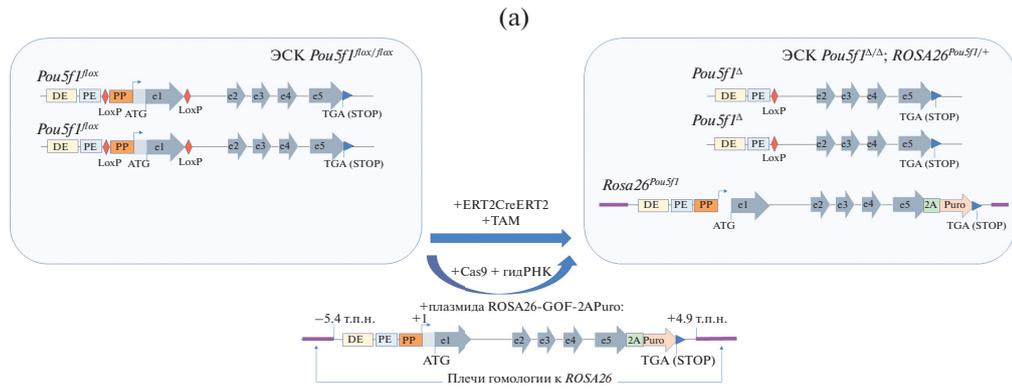


Рис. 1. Получение и первичный анализ модельной линии ЭСК $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$. (а) Схема генетических манипуляций с исходными ЭСК $Pou5f1^{flox/flox}$ позволившие делетировать промотор (PP) и удержать ЭСК в плюрипотентном состоянии посредством внедрения 10.3-т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) фрагмента гена $Pou5f1$ в локус $Rosa26$. (б) Пример результатов генотипирования получаемых клонов. На левой картинке отображены результаты проверки вырезания промотора и первого экзона $Pou5f1$. 1 – ЭСК дикого типа, 2, 4 – ЭСК $Pou5f1^{flox/flox}$, 3, 5 – ЭСК $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$. Бэнды в районе 500 п.н. соответствуют детектированию флоксированного (+34 п.н. за счет LoxP сайта) и/или дикого аллеля $Pou5f1$. Бэнд в районе 250 нуклеотидов соответствует детектированию делеции промотора и первого экзона $Pou5f1$. На правой картинке – детектирование встраивания последовательности гена $Pou5f1$ в локус $Rosa26$, которому соответствует 1.48-т.п.н. ампликон. 1 – ЭСК $Pou5f1^{flox/flox}$, 2 – ЭСК $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$. (в) Окрашивание полученных линий $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ на маркеры плюрипотентности – Oct4, Nanog, Rex1, Sox2, Klf4. Сравнение по ряду маркеров с клетками ЭСК дикого типа и клетками ЭСК $Pou5f1^{flox/flox}$. Сокращения на рисунке: PP – промотор, DE – дистальный энхансер, PE – проксимальный энхансер, e1-5 – экзоны гена $Pou5f1$, 2A – P2A сайт, PuroR – ген устойчивости к пуromину, TAM – тамоксифен.

линию ЭСК ОКО160. В нашем же случае, помимо создания гетерозиготности, единственный функциональный аллель $Pou5f1$ был помещен в новое генетическое окружение, локус $Rosa26$. За исключением некоторых морфологических отличий, полученные ЭСК $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ обладали сходными с ЭСК $Pou5f1^{flox/flox}$ и клетками дикого типа характеристиками, продолжали нормально пролиферировать, а также конститутивно экспрессировали основной маркер плюрипотентности – белок Oct4. Помимо этого, полученные клетки экспрессировали другие маркеры плюрипотентности, такие как Nanog, Sox2, Klf4, и Rex1. Интересно, что в сравнении с контролем ЭСК $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ показали более равномерное распределение Klf4, а также более высокий уровень Nanog, что полностью соответствует результатам анализа ЭСК линии ОКО160 (Karwacki-Neisius et al., 2013). Таким образом, полученный результат позволяет сделать заключение о том, что перенос одной копии гена в указанных выше размерах в эктопическое положение не отражается на плюрипотентных свойствах ЭСК мыши.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный в настоящей работе результат показывает, что перенос одной копии гена в эктопическое положение не отражается на жизнеспособности ЭСК мыши. Такие клетки сохраняют свою пролиферативную активность и экспрессируют продукт $Pou5f1$ – Oct4 на необходимом для самообновления ЭСК уровне. Таким образом, можно сделать вывод о том, что определенные ранее границы $Pou5f1$ охватывают все регуляторные элементы, необходимые для функционирования ЭСК (Yeom et al., 1996). Дальнейшие исследования, однако, должны показать, достаточно ли этих элементов для перехода $Pou5f1$ в неактивное состояние в ходе дифференцировки ЭСК, равно как и для ее нормального прохождения.

Помимо этого, полученные в настоящей работе ЭСК линии $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ будут являться ценным инструментом при изучении энхансерной функции промотора $Pou5f1$ в отношении окру-

жающих его генов. Дальнейшее сравнение уровней экспрессии генов в клетках с перенесенным локусом $Pou5f1$ и в клетках с интактным аллелем помогут указать на наличие такой функции. А дальнейшее применение методов 3C (Chromosome Conformation Capture) поможет это доказать. Изучение энхансерных функций промотора $Pou5f1$ представляет несомненный интерес ввиду его локализации в хромосомном локусе, высоко обогащенном генами, вовлеченными в различные биологические процессы.

Сравнивая нашу модель с другими известными клеточными моделями, позволяющими замещать функцию гена $Pou5f1$, можно отметить линию ЭСК ZHTc6 (Niwa et al., 2000). Создание этой линии, однако, ставило целью оценку влияния уровня белка Oct4 на судьбу ЭСК мыши и никак не отвечает нашими целями, так как промотор гена в ЭСК ZHTc6 остается интактным. Кроме того, в указанной работе для поддержания плюрипотентности ЭСК был использован трансген кДНК Oct4 под управлением CMV-промотора, что не позволяет оценить регуляцию самого $Pou5f1$.

Кроме того, интересным является факт сохранения плюрипотентных свойств полученных клеток при инактивации его эндогенной экспрессии. С одной стороны, это не удивительно, т.к. уже были получены и клетки ZHTc6, и была продемонстрирована исключительная важность проксимального и дистального энхансеров $Pou5f1$ (Choi et al., 2016). С другой стороны, плюрипотентные свойства этих клеток требуют дальнейших подтверждений, например, со стороны динамики дифференцировок в разные зародышевые листки. Недавно было показано, что существует дополнительная характеристика плюрипотентных стволовых клеток при смене наивного и праймированного состояний, так называемая “стадия розетки” (Neagu et al., 2020). Возможно, будут найдены и другие, новые стадии в процессе дифференцировки ЭСК, которые можно будет обнаружить, сравнивая полученные нами линии с контрольными. В таком случае мы также вероятно сможем охарактеризовать элементы, отвечающие за регуляцию и правильное прохождение таких стадий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим коллег лаборатории за ценные советы и обсуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00324 (создание генетических конструкций), гранта РНФ № 20-14-00242 (получение клеточных линий), а также гранта РФФИ 20-34-90083 (анализ полученных линий на соответствующие маркеры).

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 какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.А. Кузьмин, А.Н. Томилин: дизайн исследования, интерпретация данных, составление рукописи. В.В. Ермакова, А.А. Кузьмин, Е.В. Потапенко, М.Г. Островерхова, Н.А. Гурьев: создание генетических конструкций, клеточных линий, сбор и анализ данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bressan R.B., Dewari P.S., Kalantzaki M. et al. Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells // *Development*. 2017. V. 144. № 4. P. 635–648.
Chang Y.T., Hsu C.Y., Chou C.T. et al. The genetic polymorphisms of POU5F1 gene are associated with psoriasis

vulgaris in Chinese // *J. Dermatological Science*. 2007. V. 46. № 2. P. 153–156.
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.
Dao L.T.M., Galindo-Albarrán A.O., Castro-Mondragon J.A. et al. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions // *Nature Genetics*. 2017. V. 49. № 7. P. 1073.
Diao Y., Fang R., Li B. et al. A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells // *Nature Methods*. 2017. V. 14. № 6. P. 629–635.
Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming // *Genes & Development*. 2014. V. 28. № 24. P. 2679–2692.
Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R. et al. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 12. № 5. P. 531–545.
Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival // *EMBO Reports*. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083.
Neagu A., van Genderen E., Escudero I. et al. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // *Nature Cell Biology*. 2020. V. 22. № 5. P. 534–545.
Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. 1998. V. 95. № 3. P. 379–391.
Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // *Nature Genetics*. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
Yeom Y.I., 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.
Weinberger L., Ayyash M., Novershtern N., Hanna J.H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016. V. 17. № 3. P. 155.

Establishing a Cell Model for Studying the Interaction of the *Pou5f1* (*Oct4*) Promoter with the Genetic Environment

A. A. Kuzmin¹, V. V. Ermakova¹, E. V. Potapenko¹, M. G. Ostroverkhova¹, N. A. Guriev¹, and A. N. Tomilin^{1,*}

¹*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky ave. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

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

Pou5f1 (*Oct4*), a key gatekeeper of cellular pluripotency, has little been studied with the regard to roles of its regulatory *cis*-elements in transcriptional control of neighboring genes. In this study we have performed allelic deletion of the *Pou5f1* promoter with simultaneous rescue of mouse embryonic stem cell (ESC) self-renewal by a 9.8-kb fragment of *Pou5f1* knocked into the *Rosa26* locus. Our results confirm previously established *Pou5f1* gene boundaries, whereas the generated ESCs will be indispensable for further studies of *Pou5f1* promoter in transcriptional regulation of neighbor genes.

Keywords: *Pou5f1*, *cis*-regulatory elements, embryonic stem cells, pluripotency, CRISPR/Cas9, *Rosa26*, ePromoter

СЕРГЕЙ ГРИГОРЬЕВИЧ ВАСЕЦКИЙ (1935–2020)



22 августа 2020 г. ушел из жизни выдающийся советский, российский биолог развития, главный научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, доктор биологических наук Сергей Григорьевич Васецкий, проработавший в Институте со дня основания. В этом году 26 января ему исполнилось 85 лет.

После обучения на философском факультете и окончания биолого-почвенного факультета МГУ им. М.В. Ломоносова С.Г. Васецкий начинает работать с такими выдающимися советскими учеными-эмбриологами как С.Г. Крыжановский, а затем с 1962 г. с Т.А. Детлаф и А.С. Гинзбург в лаборатории экспериментальной эмбриологии Института морфологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР. Сформировавшись как ученый под их руководством, С.Г. Васецкий всю жизнь посвятил изучению основополагающих проблем биологии развития и внес большой вклад в исследование оогенеза низших позвоночных, роли цитоскелета в процессах преобразования ооцита амфибий в ходе созревания, выявление закономерностей мейоза. В 1967 г. С.Г. Васецкий защитил кандидатскую диссертацию на тему “Изучение закономерностей созревания и раннего зародышевого развития осетровых рыб в связи с возможным

применением метода термической регуляции пола у рыб”, а в 1988 г. — докторскую диссертацию на тему “Мейоз и управление развитием”.

Сергей Григорьевич Васецкий всю жизнь работал в одном институте — сначала Институте морфологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР, а после его разделения — в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Многие годы Сергей Григорьевич возглавлял лабораторию экспериментальной эмбриологии. С 1972 по 1981 г. С.Г. Васецкий являлся заместителем директора Института. На этом посту проявились его незаурядные организаторские способности, что способствовало превращению Института в уникальный современный научный центр. Он являлся одним из инициаторов и организаторов Всесоюзных, а впоследствии Всероссийских Школ по биологии развития, собиравших ведущих специалистов и молодых ученых всей страны, а также ближнего и дальнего зарубежья.

Организаторские и творческие способности Сергея Григорьевича Васецкого в полной мере проявились и в журнале “Онтогенез”. Когда этот журнал, основанный академиком Б.Л. Астауровым в 1970 г., начинает выходить в издательстве “Наука”, С.Г. Васецкий становится ответственным секретарем журнала, членом редколлегии, затем заместителем главного редактора, а с 1974 по 2019 г. его главным редактором. Сергей Григорьевич считал журнал главным делом своей жизни, его усилиями журнал стал известен за рубежом как “Russian Journal of Developmental Biology”. К написанию обзоров по основным проблемам биологии развития он привлекал ведущих отечественных и зарубежных специалистов, которые, благодаря его высокому авторитету в международной научной среде, активно участвовали в работе журнала.

С.Г. Васецкий на протяжении многих лет представлял и пропагандировал российскую науку за рубежом. Широкая биологическая эрудиция в сочетании с блестящим знанием английского, а также французского и немецкого языков, способствовали многолетнему участию С.Г. Васецкого в работе Национального комитета советских биологов (в настоящее время — Национальный комитет биологов России), Международного союза биологических наук. Он также многие годы был членом редколлегии международных журналов “Cell Differentiation”, “International Journal of Developmental Biology”, “Philosophical Transactions of the Royal Society” и “Biology International”.

Среди специалистов широко известна серия монографий “Проблемы биологии развития”, одним из наиболее активных участников этого издания, редактором и инициатором некоторых книг серии был С.Г. Васецкий. Книги серии, написанные ведущими биологами нашей страны, многие годы являются справочным пособием по эмбриологии и цитологии. Нельзя не отметить огромный труд по изданию на русском языке трехтомной монографии всемирно известного американского биолога развития Скотта Ф. Гилберта “Биология развития” (под редакцией С.Г.Васецкого и Т.А.Детлаф), сделавший эту выдающуюся книгу доступной для российского читателя.

Многие коллеги с благодарностью будут вспоминать Сергея Григорьевича, его

благожелательность, готовность помочь, в том числе с переводом статей на настоящий научный английский, обсудить свои идеи и результаты в контексте мировой науки.

Всю свою жизнь Сергей Григорьевич посвятил служению Институту, науке и людям науки. В его лице мы потеряли прекрасного человека, друга, видного ученого.

Уход из жизни Сергея Григорьевича Васецкого — невосполнимая потеря для коллектива Института, для российской науки.

*А.В. Васильев, В.Я. Бродский,
В.В. Терских, Б.Ф. Гончаров
bfgon@mail.ru*