

Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 52 № 3 2021 МАЙ–ИЮНЬ

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*), 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 «Объединённая редакция»

Оригинал-макет подготовлен ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

© Российская академия наук, 2021

© Редколлегия журнала “Онтогенез”
(составитель), 2021

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-068-20 ООО «Объединённая редакция»,
109028, г. Москва, Подкопаевский пер., д. 5, каб. 6
Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коныхин А.В.),
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+

СОДЕРЖАНИЕ

Том 52, номер 3, 2021

80 ЛЕТ КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ МГУ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

Внеклеточные везикулы плюрипотентных стволовых клеток

Е. А. Супруненко, Е. А. Сазонова, А. В. Васильев

157

ОБЗОРЫ

Геномные дубликации как основа эволюционного успеха позвоночных

А. В. Байрамов, Г. В. Ермакова, А. В. Кучерявый, А. Г. Зарайский

170

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

Развитие 3D церебральных агрегатов в желудочках мозга взрослых мышей

К. К. Сухинич, К. М. Шакирова, Э. Б. Даширмаев, М. А. Александрова

195

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Изменения популяции микроглиоцитов при формировании спинного мозга свидетельствуют об участии микроглии в регуляции нейрогенеза и синаптогенеза

Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский

208

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Механизм участия *MSX1* и *PAX9* в развитии зубов. Результаты анализа взвешенных сетей ко-экспрессии генов

Ф. Ванг, В. Джианг, Б. Чен, Р. Ли

220

ПОТЕРИ НАУКИ

Ольга Георгиевна Строева (1925–2021)

233

Contents

Vol. 52, No. 3, 2021

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

Extracellular Vesicles of Pluripotent Stem Cells

E. A. Suprunenko, E. A. Sazonova, and A. V. Vasiliev

157

REVIEWS

Genome Duplications as the Basis of the Vertebrates Evolutionary Success

A. V. Bayramov, G. V. Ermakova, A. V. Kuchryavyy, and A. G. Zاراisky

170

MECHANISMS OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

Development of 3D Cerebral Aggregates in the Brain Ventricles of Adult Mice

K. K. Sukhinich, K. M. Shakirova, E. B. Dashinimaev, and M. A. Aleksandrova

195

MECHANISMS OF NORMAL AND PATHOLOGICAL TISSUE DEVELOPMENT

Developmental Changes of Spinal Cord Microglia Indicate its Participation
in the Regulation of Neuronogenesis and Synaptogenesis

E. A. Kolos and D. E. Korzhevskii

208

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

The Mechanism of *Msx1* and *Pax9* Implication in Tooth Development Based
on the Weighted Gene Co-Expression Network Analysis

Feng Wang, Wen Jiang, Bin Chen, and Rongrong Li

220

LOSSES OF SCIENCE

Olga Georgievna Stroeveva (1925–2021)

233

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. Е. А. Супруненко^{а, *}, Е. А. Сазонова^а, А. В. Васильев^{а, б}

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

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

*e-mail: suprunenkoe@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 31.01.2021 г.

В обзорной статье представлены данные о внеклеточных везикулах (extracellular vesicles – EV), представляющих собой бислоиные фосфолипидные мембранные структуры, выделяемые разными типами клеток, содержащие белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Рассматриваются особенности их строения, биогенеза, механизмы взаимодействия с клеткой-реципиентом. Рассмотрены свойства внеклеточных везикул эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и их роль в регуляции процессов развития. Особое внимание уделено везикулам индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), их роли в поддержании плюрипотентности, а также свойствам везикул клеток, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, плюрипотентные стволовые клетки, паракринные регуляторы, репарация

DOI: 10.31857/S0475145021030071

ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений биологии развития является изучение механизмов клеточной дифференцировки на разных этапах онтогенеза, прежде всего в эмбриогенезе.

В настоящее время хорошо изучена роль стволовых клеток и компонентов микроокружения в процессе восстановления тканей (Sun et al., 2018; Terashvili, Bosnjak, 2019; Yang et al., 2020 и др.). Считается, что стволовые клетки обеспечивают репаративные процессы за счет их способности дифференцироваться под действием микроокружения и замещать утраченную (поврежденную) ткань. Однако, все больше исследований свидетельствуют в пользу того, что помимо прямой дифференцировки стволовые клетки могут регулировать репаративный процесс посредством паракринной секреции, выступая специфическими регуляторами дифференцировок (Madrigal et al., 2014; Kopala et al., 2016). Компоненты секреции клеток, в том числе везикулярный компонент, опосредуют межклеточную коммуникацию, регулируя морфофункциональное состояние ткани и органа.

Хорошо изучена роль везикул, выделяемых клетками в постнатальный период, в механизмах паракринной регуляции процессов репарации (Rani et al., 2015; Alcaayaga-Miranda et al., 2016). Од-

нако, роль внеклеточных везикул в процессах раннего развития, поддержании плюрипотентности и дифференцировке плюрипотентных клеток изучена недостаточно.

Актуальным является изучение роли внеклеточных везикул, являющихся компонентами регуляторной системы плюрипотентных стволовых клеток, в обеспечении межклеточной коммуникации в развитии.

В данном обзоре проведен анализ данных литературы, касающихся не только структуры и свойств внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток, но и их регуляторных свойств в раннем эмбриогенезе и при моделировании дифференцировки клеток в системе *in vitro*. Проведено сопоставление свойств внеклеточных везикул эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и клеток с индуцированной плюрипотентностью (ИПСК), рассмотрены свойства везикул ИПСК с учетом их онтогенетического происхождения.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: ИСТОРИЯ, СТРУКТУРА, БИОГЕНЕЗ И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

Первые сведения о везикулярных частицах появились в 1960-х годах. Вульф с коллегами (Wolf

et al., 1967) показали, что плазма крови, освобожденная от интактных тромбоцитов, содержит мельчайшие частицы, которые могут быть отделены посредством ультрацентрифугирования. Оказалось, что диаметр этих частиц, которые исследователи назвали “тромбоцитарная пыль”, составляет около 20–50 нм. Большая часть этого материала богата фосфолипидами и обладает коагулянтными свойствами, напоминающими свойства тромбоцитарного фактора 3 (тромбоцитарный тромбопластин). Интересно, что образовавшийся в результате ультрацентрифугирования супернатант, освобожденный от этих частиц, демонстрирует дефицит активности тромбоцитарного фактора 3. Основываясь на этих данных, авторы сделали предположение, что именно наличие данных частиц позволяет судить об “активации” тромбоцитов, т.е. о приобретении ими свойств, характеризующих их физиологическую активность.

Примерно в то же время стали появляться работы (Anderson, 1969), в которых было показано наличие мелких частиц – микровезикул в хрящевой матрице эпифизарной пластинки верхней части большеберцовой кости мыши. Предполагалось, что данные везикулы происходят из хондроцитов и могут играть определенную роль в иницировании кальцификации в эпифизе кости.

В начале 70-х годов XX века в ряде работ впервые был показан перенос мембранных компонентов между клетками (Michalke, Loewenstein, 1971; Espey, Stutts, 1972).

В середине 70-х годов XX века из плазмы крови теленка были выделены микровезикулы, размер которых так же лежал в пределах от 30 до 60 нм (Dalton, 1975). Несмотря на то, что о существовании внеклеточных везикул известно достаточно давно, общий термин “внеклеточные везикулы” был предложен только в 2011 году (Gyorgy et al., 2011). В эту категорию попадают все мембранограниченные внеклеточные структуры. В настоящее время собирательный термин “внеклеточная везикула” употребляется как синоним “мембранной везикулы” (обозначение, которое было ранее предложено для всех клеточных везикул).

В зависимости от происхождения и состава внеклеточные везикулы могут быть разделены на три больших класса: экзосомы (Exo), микровезикулы (MV), апоптотические тельца (AV), а также другие подмножества внеклеточных везикул (BV) (Raposo, Stahl, 2019) (табл. 1). Разделение на экзосомы и микровезикулы достаточно условно, потому что антигенный состав у них может быть смешанным, а разделение по размеру не является дискретным (Пантелеев и др., 2017). Следует учитывать, что большинство исследователей включает в понятие BV только экзосомы и микровезикулы, т.к. апоптотические тельца значительно отли-

чаются от них по биохимическому составу и биологической активности.

В настоящее время известны различные механизмы биогенеза внеклеточных везикул, коррелирующие с их типом (рис. 1). Так, например, известно, что микровезикулы и апоптотические тельца секретируются путем прямого наружного выпячивания клеточной мембраны (Latifkar et al., 2019). Клеточная активация или апоптоз приводит к увеличению притока ионов кальция, который запускает протеазы, такие как кальпаин или гельзолин. Эти активированные протеазы в свою очередь оказывают влияние на белки цитоскелета. Фактор ARF-6 (ADP-ribosylation factor 6) инициирует сигнальный каскад, в конечном итоге, активирующий сигнальный путь Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK). Это приводит к активации киназы легкой цепи миозина (MLC), в результате чего происходит ремоделирование цитоскелета, направленное на инициацию высвобождения микровезикул и апоптотических телец. Иницирование апоптоза активирует апоптотические ферменты, известные как каспазы. Каспаза-3 активирует ROCK или p21-активированную киназу (PAK2), которые регулируют процессы ремоделирования цитоскелета также посредством фосфорилирования MLC, что приводит к выделению апоптотических телец (Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018).

Формирование экзосом связано с биогенезом эндосом и напрямую зависит от формирования интралюминальных везикул в поздней эндосоме (мультивезикулярном тельце) (Huataari, Helenius, 2011; Тамкович и др., 2016; Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018; Zhang et al., 2019). Согласно общим представлениям, на первом этапе в результате инвагинации участков плазматической мембраны клетки, содержащей убиквитинированные поверхностные рецепторы, происходит формирование ранних эндосом. Причем общее распределение ранних эндосом в клетке зависит от типа клеток. Далее происходит созревание ранних эндосом и формирование поздней эндосомы (мультивезикулярного тельца), заполненной интралюминальными везикулами, которые в конечном счете и представляют собой будущие экзосомы (Kowal et al., 2014). Считается, что формирование интралюминальных везикул начинается еще в ранней эндосоме. В зависимости от типа клеток в составе одного мультивезикулярного тельца может быть несколько таких везикул. Большая часть интралюминальных везикул высвобождается в межклеточное пространство при слиянии мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной клетки. Молекулярные механизмы формирования интралюминальных везикул достаточно хорошо изучены в настоящее время. Биогенез интралюминального комплекса везикул связан в первую очередь с эндосомальным комплексом сортировки

Таблица 1. Основные характеристики различных типов внеклеточных мембранных везикул (по Cufaro et al., 2019 с дополнениями)

	Экзосомы	Микровезикулы	Апоптотические тельца	Большие онкосомы
Размер (диаметр)	30–100 нм	100–1000 нм	1–5 мкм	1–10 мкм
Концентрация	1.10–1.21 г/мл	–	1.16–1.28 г/мл	–
Морфология	Чашеобразная	Различные формы	Гетерогенная	Большой размер – различные формы
Липидный состав	Холестерол, церамид, сфингомиелин, низкое содержание фосфатидилсерина, липидные рафты	Высокое содержание фосфатидилсерина, холестерол	Высокое содержание фосфатидилсерина	Высокое содержание фосфатидилсерина, холестерол
Белковые маркеры	Alix, CD63, CD9, CD81	Селектины, интегрины, CD40, матриксная металлопротеиназа	Гистоны	ARF6, CK18, GAPDH, матриксная металлопротеиназа, комплекс онкогенных белков
Происхождение	Поздние эндосомы, (мультивезикулярные тельца)	Плазматическая мембрана	–	Плазматическая мембрана
Способ внеклеточного высвобождения	Экзоцитоз мультивезикулярного тельца	(Блеббинг/баддинг)	Блеббинг	Баддинг
Состав	Белки, микроРНК, ДНК*, мРНК	Белки, микроРНК, ДНК, мРНК	Белки, ДНК, микроРНК, мРНК	Белки, микроРНК, мРНК, ДНК

* Показано в ряде работ (Guescini et al., 2010; Thakur et al., 2014; Kalra et al., 2016 и др.).

ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), который состоит примерно из двадцати белков и которые собраны в четыре комплекса (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) и рядом вспомогательных белков, таких как, например, AAA-type ATP-ase VPS4, VTA1 и Alix (Henne et al., 2011; Colombo et al., 2013), липидов (церамиды), тетраспанина и т.д.

Однако, помимо данного пути биогенеза интралюминального комплекса везикул и образования мультивезикулярного тельца существуют независимые от ESCRT механизмы биогенеза экзосом. Они обеспечены, прежде всего, такими компонентами, как липиды, тетраспанины и белки теплового шока (Theos et al., 2006; Airola et al., 2013; Kowal et al., 2014; Zhang et al., 2019).

На этапе формирования мультивезикулярное тельце может либо деградировать, образуя эндоллизосому, либо непосредственно слиться с плазматической мембраной клетки, обеспечив тем самым секрецию своего содержимого – интралю-

минального комплекса везикул (экзосом) – в межклеточное пространство.

Важная роль в обеспечении регуляции биогенеза экзосом принадлежит семейству Rab ГТФ-аз. Известно, что на мембране формирующихся ранних эндосом, образуются домены, содержащие Rab4, Rab5, Rab11. Причем Rab5 является одним из главных регуляторных компонентов, обеспечивающих созревание эндосом (Huotari, Helenius, 2011; Kowal et al., 2014). В транспорт мультивезикулярных частиц к плазматической мембране и в секрецию экзосом также вовлечены несколько Rab-белков (например, Rab11, Rab27A, Rab27B и Rab35) (Jae et al., 2015; Yang et al., 2019; Mughees et al., 2020) Предполагается, что эти белки могут действовать на различные мультивезикулярные тельца (Zhang et al., 2019).

Слияние мультивезикулярных телец с плазматической мембраной приводит к высвобождению в межклеточное пространство интралюминальных везикул в виде экзосом. Это является заключительным и ключевым этапом секреции

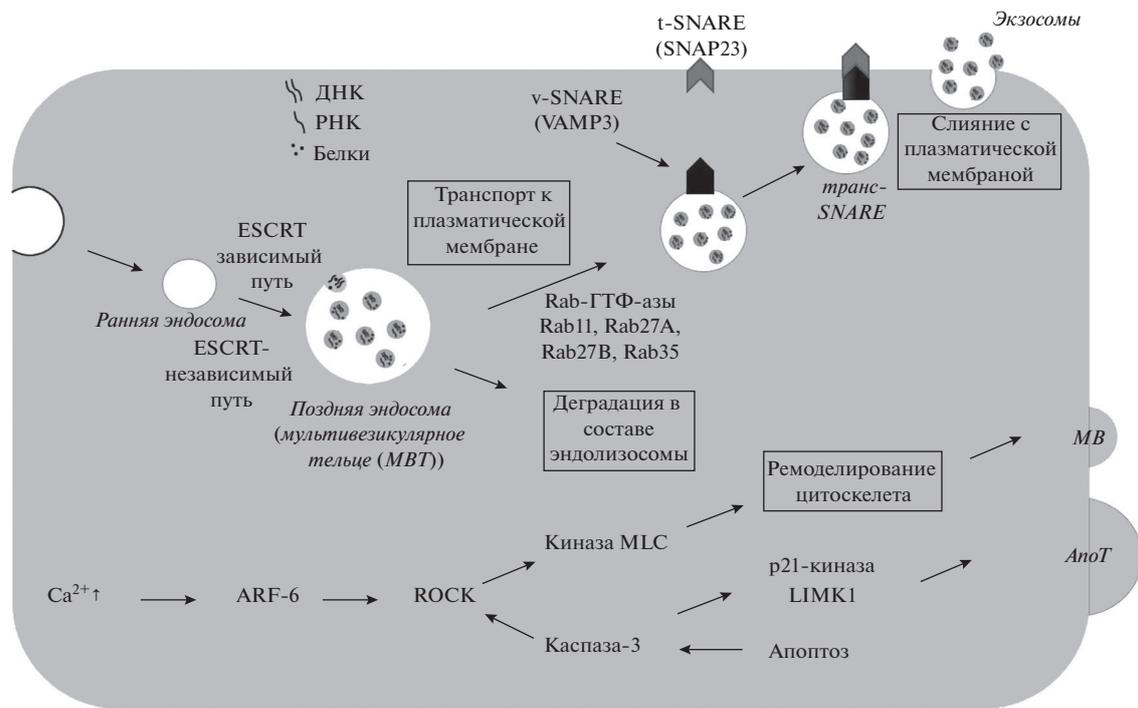


Рис. 1. Формирование различных типов внеклеточных везикул (по материалам статей Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018; Yang et al., 2019). ARF-6 – АДФ-рибозилирующий фактор-6; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; MLC – легкая цепь миозина; p21-киназа (PAK2) – серин/треонин протеинкиназа; LIMK1 – LIM-киназа 1; ESCRT – комплекс эндосомальной сортировки; SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor proteins.

экзосом. Основная роль в регуляции данного этапа принадлежит белкам семейства SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor proteins), которые непосредственно вовлечены в процесс экзоцитоза (Yang et al., 2019).

Экзосомы представляют собой бислоиные структуры из мембранных липидов, секретируемые практически всеми типам клеток организма, включая как стволовые, так и уже дифференцированные клетки. Размер экзосом варьирует от 20 до 100 нм. Состав экзосом зависит от типа клеток и условий микроокружения. Экзосомы содержат различные белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Следует отметить, что компоненты экзосом очень разнообразны и их набор зависит от типа клеток, которые секретируют эти экзосомы. Известно, что в состав экзосом могут входить 4400 различных белков, 194 липидов, 1639 мРНК и порядка 764 микроРНК (Zhang et al., 2019). Такое многообразие компонентов, несомненно, свидетельствует о структурной сложности экзосом и их потенциальном функциональном разнообразии.

Обычно экзосомальные белки представлены тетраспанинами (CD9, CD63, CD81, CD82), интегринами, белками теплового шока (HSP70 и HSP90), специфическими белками, вовлеченными

в формирование и секрецию экзосом (ESCRT-комплекс), белками клеточной адгезии (интегрины, лактадгерин, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)), белками, определяющими биогенез мультивезикулярных телец (Tsg101, Alix, Vps, Rab – ГТФ-азы), белками, ассоциированными с мембранным транспортом; белками цитоскелета, сигнальными белками и т.д. Некоторые белки экзосом эволюционно консервативны, например, тетра-спанины, Alix и Tsg101. Ряд других белков характеризует принадлежность экзосом к определенному типу клеток, например, CD80 и CD86, которые присущи дендритным клеткам (Alcayaga-Miranda et al., 2016; Rashed et al., 2017).

Состав липидов экзосом в основном представлен липидами плазматической мембраны, такими как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин и фосфатидилинозитол. Однако, следует отметить, что их соотношение в мембранах экзосом отличается от такового в мембранах секретирующих их клеток (Тамкович и др., 2016). Также авторы отмечают, что повышенное содержание сфингомиелина и фосфатидилинозита определяет повышенную устойчивость мембран экзосом, обеспечивая защиту их от лизиса (деградации) во внеклеточной среде, в том числе в биологических жидкостях.

Липиды определяют морфологические и функциональные особенности экзосом, такие как жесткость экзосомы или особенности крепления на внешней стороне мембраны белковых молекул, обеспечивающих слияние экзосомы с плазматической мембраной клетки.

Помимо различных типов белков и липидов экзосомы включают в себя различные типы РНК: информационную РНК (messenger RNA (mRNA)), кольцевые РНК (circular RNA), некодирующие РНК (lncRNA) и различные микроРНК (Coutmans et al., 2017; Li et al., 2018). МикроРНК, как известно, способны регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем ингибирования трансляции их мРНК-мишеней (таргетных мРНК) или индукции их деградации (Sayed, Abdellatif, 2011). В настоящее время известно, что экспрессия более 60% генов человека регулируются микроРНК. Поэтому анализ микроРНК, входящих в состав экзосом, дает наиболее полную информацию о статусе продуцирующих их клеток.

Экзосомы являются носителями связанных с мембраной сигнальных белков, включая лиганды рецептора Notch (Sheldon et al., 2010) и секреторные белки семейств Wnt и Hedgehog (НН) (Vyas et al., 2014; McGough, Vincent, 2016). Ряд авторов полагает, что сигнальные белки Wnt и НН могут либо располагаться в липидном бислое, либо связываться с мембраной экзосомы другими белками. Таким образом, в норме (при нормальном развитии) экзосомы могут обеспечивать работу трех основных сигнальных путей: Wnt, НН и Notch. При развитии патологических процессов в организме спектр сигнальных путей может быть изменен.

Экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, активно взаимодействуя с окружающими клетками, причем выявлено несколько механизмов такого взаимодействия. Регуляторная роль везикул может обеспечиваться переносом их содержимого в клетку-реципиент за счет эндоцитоза или прямого слияния мембраны везикулы с мембраной клетки-реципиента. В настоящее время известны клатрин-опосредованный эндоцитоз, а также клатрин-независимые пути слияния с мембраной (опосредованное кавеолином поглощение, макропиноцитоз, фагоцитоз и опосредованная липидным плотом интернализация) (Jeske et al., 2020). Кроме того, обеспечение регуляторной роли везикул может осуществляться за счет связи экзосомы с поверхностным рецептором клетки-реципиента. Это вызывает запуск соответствующего регуляторного каскада в клетке-реципиенте без проникновения везикулы в клетку. И, наконец, следует отметить возможность переноса специфических рецепторов на клеточную мембрану клетки-реципиента, что изменяет рецепторную специфичность последней (Zhang et al., 2019).

Наличие такого числа способов (путей), обеспечивающих взаимодействие везикул с клетками, несомненно свидетельствует об активной роли самих клеток в поглощении везикул. Встает вопрос: насколько компетентны окружающие клетки к восприятию данных регуляторов? Возможно, наличие определенной степени компетенции окружающих клеток формирует и поддерживает функционал ниши. Известны случаи полной индифферентности определенных типов клеток к регуляторному потенциалу внеклеточных везикул – например, клетки эндотелия в составе гематоэнцефалического барьера способны осуществлять лишь транзит внеклеточных везикул (Jeske et al., 2020).

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Изучение регуляторного потенциала плюрипотентных стволовых клеток является не только одной из фундаментальных задач биологии развития и клеточной биологии, но и представляет потенциальный практический интерес.

При изучении предимплантационных стадий развития бластоцисты и ранних фаз имплантации (на моделях *in vitro*) обнаружено, что везикулы ЭСК поддерживают дифференциальное регулирование клеточной активности: с одной стороны, они участвуют в поддержании плюрипотентного состояния клеток ВКМ, а с другой, способны регулировать функциональное состояние клеток трофобласта, влияя на их подвижность (регулируя, таким образом, процесс имплантации) (Battaglia et al., 2019). Авторы показали наличие в полости развивающейся бластоцисты человека экзосом и мелких микровезикул. Это является свидетельством активной клеточной коммуникации, обеспечивающей взаимодействие ВКМ и трофобласта. В ходе анализа состава жидкости, полученной из полости бластоцист, авторами были выделены около 89 микроРНК, 80% из которых находились в составе внеклеточных везикул (преимущественно экзосом). Среди них можно указать miR-302a, miR-302b, miR-302c и miR-367-3p, кластер miR-302/367, miR-371a, miR-372, miR-373, семейство miR-290/miR-371, miR-17, miR-19a, miR-19b, miR20a и miR-92a (члены семейства miR17-92a-1, известного как ОнкоМикроРНК), miR-20b, miR-106a и т.д. Таким образом, в составе внеклеточных везикул, выделенных из жидкости полости бластоцисты, были обнаружены различные микроРНК, необходимые как для поддержания плюрипотентного состояния клеток ВКМ, так и усиливающие подвижность клеток трофобласта, тем самым способствуя процессу имплантации (Battaglia et al., 2019). Кроме этого, в составе везикул были обнаружены функциональные мо-

лекулы, обеспечивающие ремоделирование матрикса. Биоинформационный анализ выделенных микроРНК с помощью баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) показал, что данные микроРНК регулируют такие важные сигнальные пути как сигнальный путь поддержания плюрипотентности стволовых клеток, Hippo, MAPK, TGF- β и Wnt. Кроме того, они регулируют клеточный цикл (точки перехода G₁/S и G₂/M), процессы апоптоза, структуру щелевых контактов, состояние внеклеточного матрикса (взаимодействие белков внеклеточного матрикса с рецепторами клеток) и некоторые другие процессы (Battaglia et al., 2019). Интересно, что часть микроРНК, содержащихся в полости бластоцисты, в том числе и экзосомальные микроРНК, присутствуют уже в гаметтах, причем преимущественно в ооцитах. Однако многие микроРНК впервые синтезируются клетками эмбриона (микроРНК-302a, микроРНК-302b, микроРНК-302c, микроРНК-367-3p и др.). Именно они являются ключевыми микроРНК, обеспечивающими поддержание плюрипотентности стволовых клеток (Battaglia et al., 2019).

In vitro, на линии клеток HTR8/SVneo, являющейся наиболее точной моделью трофобласта, показано, что при культивировании данных клеток в присутствии внеклеточных везикул ЭСК происходит повышение подвижности клеток трофобласта (Desrochers et al., 2016). Причиной этого является опосредованное фосфорилирование двух киназ: MAPK сигнального пути JNK (c-Jun N-terminal kinases) и FAK (focal adhesion kinase) (P-FAK). Фосфорилирование обеспечивается взаимодействием фибронектина и ламинина (ассоциированных с внеклеточными везикулами), с соответствующими интегринами клеток трофобласта (фибронектин взаимодействует с $\alpha 5\beta 1$ -интегрином, а ламинин — с соответствующим рецептором). В настоящее время хорошо известно, что при активации FAK увеличивается адгезионная способность клеток трофобласта, необходимая для процесса имплантации (Greening et al., 2016; Kurian et al., 2019).

Помимо регуляции подвижности клеток трофобласта, везикулы ЭСК обеспечивают поддержание плюрипотентного состояния клетками эпибласта, предотвращая тем самым их преждевременную дифференцировку (Hur et al., 2020). Показано, что добавление везикул, полученных в ходе культивирования ЭСК, в среду культивирования бластоцист мыши, приводит к сохранению плюрипотентности части клеток эпибласта на фоне начавшейся дифференцировки ВКМ в бластоцистах контрольных групп (Hur et al., 2020). Встает закономерный вопрос: каким образом везикулы, добавленные в среду инкубации и поддерживающие плюрипотентность, оказывают влияние на клетки ВКМ? Логично предположить, что

везикулы попадают в клетки ВКМ с использованием механизма трансцитоза. Такой механизм показан для клеток эндотелия в составе гематоэнцефалического барьера (Jeske et al., 2020). В этом случае клетки трофобласта должны обладать избирательной чувствительностью к везикулам, обеспечивающим поддержание плюрипотентности, трансдуцируя сигнал к клеткам ВКМ. Кроме того, следует допустить, что разный ответ клеток ВКМ и трофобласта связан с различными механизмами реализации ответа клеток на действие везикул.

Внутриклеточные механизмы реализации регуляторных воздействий, направленных на поддержание плюрипотентного состояния, в настоящее время еще недостаточно изучены. С одной стороны, в литературе есть данные, свидетельствующие о возможности эпигенетических регуляций посредством внеклеточных везикул ЭСК. Так было показано, что при культивировании ЭСК мыши в среде, не содержащей ингибиторов GSK3 β и MEK1/2 (т.е. при индукции клеток ЭСК к дифференцировке), добавление в среду культивирования везикул ЭСК приводило к возврату части клеток в плюрипотентное состояние. Это сопровождалось снижением уровня триметилирования лизина 27 в гистоне H3 (H3K27me3) и повышением уровня экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности Oct 3/4, Nanog. Причем авторы отмечают, что больший эффект достигался при совместном использовании экзосом и микровезикул (Hur et al., 2020).

С другой стороны, внеклеточные везикулы могут способствовать поддержанию плюрипотентного состояния путем модуляции взаимодействия компонентов внеклеточного матрикса с интегринами, находящимися на поверхности самих ЭСК, включая модуляцию классического пути регуляции интегрин/FAK (focal adhesion kinase) (Hur et al., 2020). Каким образом внеклеточные везикулы активируют FAK? Было показано, что фибронектин, ассоциированный с внеклеточными везикулами (экзосомами и микровезикулами) является ключевым регулятором, обеспечивающим поддержание плюрипотентного состояния стволовыми клетками (Hur et al., 2020). Фибронектин внеклеточных везикул способен взаимодействовать с интегринами, ассоциированными с мембранами стволовых клеток, и, тем самым, стимулировать активацию FAK, поддерживая плюрипотентное состояние данных клеток.

Заслуживает внимания тот факт, что существуют различные механизмы регуляции поддержания плюрипотентного состояния клетками человека. Известно, что в ЭСК человека фокальные контакты не образуются, и при этом активен сигнальный путь FAK (Vitillo et al., 2016). У этих клеток FAK обнаруживается на мембране и в цитоплазме, а активность дефосфорилированной FAK

относительно высока в ядре (Villa-Diaz et al., 2016). Это оказывает влияние на поддержание плюрипотентного состояния ЭСК человека (Vitillo, Kimber, 2017). Учитывая некоторые общие черты ESC и опухолевых клеток, можно предположить, что ФАК выполняет у них сходные функции (Ho et al., 2012). Nanog связывает промотор ФАК, способствуя повышению его активности, а ФАК, в свою очередь, фосфорилирует Nanog, дозозависимо повышая его активность, что способствует поддержанию плюрипотентности ЭСК.

Следует отметить, что наличие ядерной ФАК не характерно для дифференцированных клеток. Возможно, наличие неканонического (ядерного) пути регуляции ФАК и определяет механизм воздействия внеклеточных везикул, связанный с поддержанием плюрипотентного состояния клеток ЭСК.

В настоящее время имеются неоднозначные данные по поводу участия пути ФАК в регуляции самообновления и поддержания плюрипотентности стволовых клеток. Ряд авторов указывает на то, что компоненты внеклеточного матрикса (ламелин, фибронектин и витронектин), взаимодействуя с определенными типами интегринов на поверхности стволовых клеток человека, способны запускать механизмы обеспечения поддержания плюрипотентного состояния данных клеток (Braam et al., 2008; Rodin et al., 2010; Vitillo et al., 2016). Показано, что ассоциация киназ (ФАК) с интегринными определяет жизнеспособность ЭСК человека, сохранение их недифференцированного состояния. Длительное ингибирование данной киназы или снижение уровня экспрессии кодирующего ее гена приводит к дифференцировке ЭСК (Vitillo et al., 2016). Результаты других работ, проведенных на стволовых клетках мыши, свидетельствуют об обратном (Hayashi et al., 2007; Toya et al., 2015). Кроме того, авторы указывают, что именно тип белков внеклеточного матрикса определяет функциональное состояние стволовых клеток: если фибронектин и ламелин способствуют активации ФАК и Akt, вызывая дифференцировку плюрипотентных клеток, то коллаген, наоборот, способствует поддержанию плюрипотентного состояния (Hayashi et al., 2007).

Интересным является то, что различие в результате работы данного пути регуляции (поддержание самообновления или дифференцировка) определяется состоянием (типом) плюрипотентных стволовых клеток. Хорошо известно о существовании двух состояний плюрипотентности у мыши – Naïve и Primed. Плюрипотентные клетки в состоянии Naïve могут быть получены из ВКМ предимплантационных бластоцист, а в состоянии Primed – из эпибласта постимплантационных бластоцист. Плюрипотентные клетки в состоянии Naïve и Primed отличаются по цитоморфоло-

гическим характеристикам, профилю экспрессии генов и другим параметрам (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Chen, Lai, 2015). Последние работы (Dodsworth et al., 2020) показали, что плюрипотентные клетки человека в состоянии Naïve и Primed различаются по профилю экспрессии микроРНК. Так, при анализе микроРНК в плюрипотентных клетках человека, было показано, что Naïve состояние характеризуется наличием таких микроРНК как miR-143-3p и miR-22-3p, а miR-363-5p, семейство miR-17 (miR-18b-3p, -20b-5p, -20b-3p, -106a-5p), а семейство miR-302 характеризуют Primed состояния. Для Naïve состояния клеток человека характерен достаточно высокий уровень экспрессии miR-371-373, являющейся гомологом miR-290 мыши, также наиболее высоко экспрессируемых микроРНК в Naïve плюрипотентных клетках мыши. Таким образом, профиль экспрессии микроРНК обусловлен состоянием клеток, а не видовыми различиями. Это лишний раз подчеркивает важность оценки паттерна микроРНК как характеристического для определения функционального состояния клетки.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ

Влияние везикул ЭСК на поддержание плюрипотентного состояния клеток было косвенно показано на моделях конкретных линий дифференцировок.

Так, еще в начале XXI века было исследовано влияние внеклеточных везикул, полученных в ходе культивирования ЭСК мыши (линия ES-D3), на линию гематопозитических стволовых клеток (Ratajczak et al., 2006). Было показано, что в определенной концентрации внеклеточные везикулы ЭСК способны повышать жизнеспособность стволовых гемопоэтических клеток, усиливать их пролиферацию, а также повышать уровень экспрессии генов – маркеров плюрипотентности (Oct-4, Nanog и Rex-1) и ранних маркеров гемопоэтических стволовых клеток (Scl, НохВ4 и GATA 2). Аналогичные данные были получены и в более поздних работах, при изучении влияния внеклеточных везикул ЭСК мыши на прогениторные клетки сетчатки – мюллеровские клетки. Было показано, что внеклеточные везикулы способны переносить специфические мРНК в клетки-мишени и стимулировать в них не только экспрессию генов-маркеров плюрипотентности, но и генов, специфичных для ранних стадий развития сетчатки, вызывая дедифференцировку данных прогениторных клеток, возобновление клеточного цикла с последующей дифференцировкой разных типов клеток сетчатки (амакриновые,

ганглиозные клетки, а также палочковых рецепторов) (Farber, Katsman, 2016).

Очевидно, регуляторный потенциал внеклеточных везикул плюрипотентных клеток не ограничен регуляцией дедифференцировок клеток-реципиентов в процессах тканевой репарации. Достаточно много исследований указывает на то, что внеклеточные везикулы ЭСК влияют на пролиферацию клеток и обладают антиапоптотическим эффектом. Так, интересные данные были получены при изучении влияния внеклеточных везикул ЭСК на процесс заживления раны у стареющих мышей. Оказалось, что экзосомы ЭСК вызывают восстановление у пожилых мышей следующих функций эндотелиальных клеток, нарушенных при старении: пролиферативной активности, миграции и формирования сосудистых трубок в месте раны (Chen et al., 2019). Кроме этого, экзосомы могут снижать окислительный стресс, повышая активность эндогенной антиоксидантной системы. Восстановление возрастной ангиогенной дисфункции авторы данного исследования связывают с наличием в экзосомах микроРНК-200А. Оказалось, что именно микроРНК-200А выступает ключевым регулятором сигнального пути KEAP 1 – Nrf2 (Kelch-like ECH-associated protein 1 – nuclear factor erythroid 2 – related factor 2), контролирующего экспрессию ряда генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, например, гемоксигеназу 1 (HO-1). Показано, что микроРНК-200А, содержащаяся в экзосомах ЭСК, снижает уровень экспрессии KEAP 1, способствуя активации Nrf2 (негативная регуляция). Такая активация Nrf2 приводит, в конечном итоге, к торможению старения (Chen et al., 2019).

Разработка методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) путем генетического репрограммирования соматических клеток постнатального организма, поставила вопрос о степени идентичности ИПСК и ЭСК. Этот вопрос особенно актуален, так как клетки с индуцированной плюрипотентностью в настоящее время используются не только как модель для изучения направленной дифференцировки клеток, но и в регенеративной биомедицине. Следует учитывать онтогенетическое происхождение плюрипотентных клеток.

В ряде работ было показано, что профиль экзосом ИПСК определяется тем типом клеток, из которых в результате репрограммирования был получен данный тип ИПСК. Например, было отмечено, что экзосомы ИПСК, которые были получены из кардиальных фибробластов, содержали в том числе и ряд функциональных кардиопротекторных микроРНК (микроРНК-21 и микроРНК-210) (Wang et al., 2015; Jung et al., 2017; Jeske et al., 2020). Эти свойства ИПСК, несомненно, следует учитывать при использовании раз-

личных типов ИПСК и их внеклеточных везикул, для получения заданных клеточных дифференцировок.

В некоторых работах указывается на то, что далеко не все типы функциональных регуляторов, имеющихся в самой клетке, будут присутствовать во внеклеточных везикулах. При молекулярно-генетическом анализе (секвенирование и ПЦР в реальном времени) ИПСК, полученных путем репрограммирования фибробластов мыши, было показано наличие 282 различных микроРНК, в то время как в везикулах ИПСК было представлено только 199 (Adamiak et al., 2018). Анализ показал наличие микроРНК, регулирующих поддержание плюрипотентного состояния (miR-290-295 семейства), miR-19b, miR-20a, miR-126-3p, miR-130a-3p, miR-210-3p, а также онко-микроРНК семейства miR-17-92 не только в самих ИПСК, но и в составе внеклеточных везикул. Данные микроРНК вовлечены в регуляцию ангиогенеза, клеточного цикла и процессов старения (Mendell, 2008; Gruber et al., 2014). Однако, для ряда микроРНК была показана дифференциальная экспрессия: такие микроРНК, как, например, let-7, miR-145, miR-302a-5p были преимущественно представлены во внеклеточных везикулах. Данные микроРНК регулируют клеточную пролиферацию, апоптоз и поддержание плюрипотентного состояния и самообновление (Cordes et al., 2009). Выявлено сходство сигнальных путей, посредством которых обеспечивается регуляторная активность внеклеточных везикул ЭСК и ИПСК в клетках-реципиентах. Это, например, Wnt, PI3K-Akt и MAPK сигнальные пути, которые регулируют активность элементов цитоскелета (актинового цитоскелета), фокальные контакты и процессы взаимодействия белков внеклеточного матрикса с их рецепторами (Adamiak et al., 2018).

На нескольких регенерационных моделях показано, что внеклеточные везикулы ИПСК способствуют восстановлению целостности ткани. В основе данного положительного эффекта лежат такие процессы, как регуляция пролиферации клеток, миграция клеток, снижение уровня апоптоза, ремоделирование внеклеточного матрикса и т.д. *In vitro* показано, что экзосомы ИПСК способствовали восстановлению жизнеспособности эндотелиальных клеток пуповины человека (HUVESCs) и способствовали формированию в культуре капилляро-подобных структур, после того, как данные клетки находились в условия гипергликемии (повышенное содержание глюкозы в среде культивирования (33 мМ)) (Ding et al., 2018).

На моделях повреждения печени (индуцированный CCl₄ фиброз печени мыши; перевязка желчного протока) было показано, что внеклеточные везикулы ИПСК в значительной степени

способствуют снижению фибротизации ткани печени, снижая пролиферацию и активацию звездчатых клеток печени (клеток Ито) (Povero et al., 2019). Об этом свидетельствовало снижение уровня экспрессии ряда про-фибротических маркеров: α -гладкомышечного актина, коллагена I α 1, фибронектина и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (TIMP-1). Кроме этого, анализ транскриптома показал, что у активированных клеток Ито под действием внеклеточных везикул ИПСК происходит изменение уровня экспрессии примерно 300 генов (60 генов снижает уровень экспрессии, а 235 генов – повышает). В составе внеклеточных везикул ИПСК были также выявлены некоторые микроРНК (микроРНК-10b-5p, микроРНК-302-3p и микроРНК-92b-3p), обладающих потенциальными антифибротическими свойствами. Следует отметить, что уровень данных микроРНК был достаточно высок

На моделях старения кожи *in vitro* (фотостарение (уф-облучение 315 нм) и естественное старение (культивирование более 30 пассажей)) было показано, что экзосомы ИПСК снижают в фибробластах кожи уровень экспрессии ассоциированной со старением β -галактозидазы и матриксной металлопротеиназы 1/3, стимулируют пролиферацию и миграцию фибробластов, а также восстанавливают экспрессию коллагена I типа, заметно пониженную при старении (Oh et al., 2018; Jeske et al., 2020).

In vivo, на модели реперфузированного инфаркта миокарда у мышей, было проведено сравнение результатов применения внеклеточных везикул ИПСК и самих ИПСК для репарации повреждений сердечно-сосудистой системы (Adamiak et al., 2018). Было показано, что применение внеклеточных везикул ИПСК и самих ИПСК приводит к улучшению функции левого желудочка. Однако, применение экзосом приводило к более полному восстановлению функций левого желудочка сердца, чем трансплантация самих ИПСК. *In vitro* экзосомы ИПСК стимулируют ангиогенез и способствуют миграции эндотелиальных клеток. Кроме того, в данной работе было продемонстрировано важное преимущество применения внеклеточных везикул ИПСК по сравнению с самими ИПСК: при трансплантации ИПСК наблюдали образование тератом.

В настоящее время широко изучается возможность изменения регуляторных возможностей паракринного компонента плюрипотентных клеток в процессе направленной дифференцировки.

Так, известно, что при терапии инфаркта миокарда внеклеточные везикулы, полученные от дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов, обладают более высокой способностью стимулировать регенерацию, чем сами ИПСК. Везикулы способствуют восстановлению сердечной ткани после инфаркта посредством регуляции

аутофагии в кардиомиоцитах в условиях гипоксии (Santoso et al., 2020).

На модели ишемии конечности мыши было показано, что экзосомы эндотелиальных клеток-производных ИПСК способствуют репарации сосудистой системы за счет стимуляции ангиогенеза. Было показано, что при направленной дифференцировке эндотелиальных клеток из ИПСК, в них в значительной степени возрастает уровень микроРНК-199b-5p. Эта микроРНК – один из ключевых регуляторов ангиогенеза, оказывающих стимулирующее действие на данный процесс. Функциональная роль этой микроРНК состоит в Jagged-1-зависимой регуляции VEGFR2. *In vitro* было показано, что экзосомы эндотелиальных клеток, производных ИПСК, усиливают пролиферацию, миграцию и формирование эндотелиальных сосудистых трубок в культуре HUVECs (Ye et al., 2019).

Кроме того, было показано стимулирующее воздействие везикул, полученных от дифференцированных из ИПСК нейронов, на клетки первичной культуры гранулярных клеток зубчатой извилины головного мозга человека: происходило усиление пролиферации клеток и наблюдалась их нейральная дифференцировка (Sharma et al., 2019).

Направление дифференцировки ИПСК определяет регуляторные свойства их везикул. Так, были сопоставлены результаты действия на кортикальные сфероиды везикул клеток-производных ИПСК и клеток, полученных в результате нейральной и мезодермальной (кардиомиоцитарной) дифференцировки этих ИПСК (Marzano et al., 2019). Оказалось, что везикулы, полученные от недифференцированных ИПСК, способствовали значительному усилению пролиферации клеток сфероида (оценивалось число клеток, включивших метку BrdU). Такой эффект отсутствовал при использовании в эксперименте везикул, полученных от клеток обеих линий дифференцировки. Везикулы клеток, полученных в ходе нейральной дифференцировки (т.е. нейральных стволовых клеток), способствовали интенсивному росту аксонов у клеток кортикальных сфероидов (оценивалось по наличию β III-tubulin положительных клеток). Такого эффекта не наблюдалось при использовании внеклеточных везикул, полученных от недифференцированных ИПСК или клеток линии мезодермального направления дифференцировки. Таким образом, специфика действия везикул проявляется только в процессе дифференцировки ИПСК. При этом параллельно снижается регуляционная активность везикул, обеспечивающая общие функции клеток, такие как пролиферативная активность. Так, в популяции плюрипотентных клеток основная роль везикул – поддержание плюрипотентного состояния. В то же время, с началом клеточных дифференцировок основной

функцией везикул становится регуляция последовательных этапов дифференцировки клеток.

Таким образом, изучение паракринного везикулярного компонента плюрипотентных стволовых клеток даст возможность более полно судить о механизмах клеточных регуляций в раннем развитии и в регенерационных процессах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, как один из компонентов паракринной секреции клеток, обеспечивают межклеточную коммуникацию. Благодаря наличию в них факторов, регулирующих функции клеток, они обеспечивают поддержание гомеостаза ткани или усиливают направленные изменения клеток в ходе онтогенетических и регенерационных процессов. Конкретный набор этих факторов зависит от состояния клеток – продуцентов везикул. Внеклеточные везикулы плюрипотентных стволовых клеток, благодаря наличию в них мРНК ряда транскрипционных факторов, поддерживают определенную степень дедифференцировки клеток. Поскольку везикулы содержат белки – компоненты основных сигнальных путей, они также способны регулировать специфические дифференцировки клеток-реципиентов. Например, они могут регулировать ангиогенез за счет компонентов Notch-сигналинга (McGough, Vincent, 2016). Кроме того, везикулы могут регулировать дифференцировку клеток на посттранскрипционном уровне, поскольку содержат микроРНК. Следует учитывать, что показана определенная рецепторная специфичность везикул для компетентных клеток. Это способствует повышению специфичности регуляторного потенциала везикул.

К настоящему времени накоплены некоторые данные о роли внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток в регуляции раннего развития млекопитающих, в том числе, человека. Эти данные свидетельствуют о становлении дифференциальной регуляторной специфичности везикул еще в предимплантационный период. С одной стороны, внеклеточные везикулы способны обеспечивать поддержание плюрипотентного состояния клеток. С другой стороны, они регулируют функционирование клеток эмбриона (например, подвижность клеток трофобласта при имплантации). Такая специфика регуляторных возможностей сохраняется в ходе дальнейших дифференцировок. Об этом свидетельствуют данные, полученные на разных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Важно, что регуляторная активность везикул, связанная с поддержанием плюрипотентности стволовых клеток, постепенно снижается, но не утрачивается полностью. В то же время регуляторная активность везикул, связанная с направленной дифференцировкой плюри-

потентных стволовых клеток, постепенно повышается. Выявленные особенности регуляторных возможностей разных внеклеточных везикул (везикул плюрипотентных клеток и везикул клеток-производных плюрипотентных клеток), могут служить основой для разработки методов их дифференциального использования для репараций тканей.

Следует учитывать, что регуляция пролиферативной активности клеток везикулами плюрипотентных клеток может осуществляться благодаря наличию в них микроРНК, обеспечивающих контроль этапов клеточного цикла. С этим может быть связано проявление онкогенного потенциала везикул плюрипотентных стволовых клеток. Тем не менее, данные литературы указывают на то, что внеклеточные везикулы обладают более низкой иммуногенностью и меньшей вероятностью индукции опухолей, чем сами стволовые клетки (Taheri et al., 2019).

Регуляторные возможности внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток могут различаться в связи с разным онтогенетическим происхождением самих клеток (ЭСК и ИПСК), а также в связи с типом клеток, из которых были получены ИПСК в результате репрограммирования. Мы полагаем, что у клеток с индуцированной плюрипотентностью может проявляться гистотипическая память, определяющая специфичность их внеклеточных везикул. Для плюрипотентных стволовых клеток разных клеточных типов уже выявлены важные закономерности дифференциальной регуляторной активности внеклеточных везикул. Эти данные могут служить основой для разработки способов повышения адресности воздействий, направленных на стимуляцию репарации тканей.

Таким образом, при анализе направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, необходимо учитывать характеристики регуляторных возможностей везикулярной паракринной компоненты. На ряде моделей показано, что использование внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток предпочтительнее использования самих плюрипотентными клетками. Это позволяет рассматривать внеклеточные везикулы как альтернативу клеточной трансплантации для репарации тканей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность профессору Владимиру Александровичу Голиченкову и ведущему научному сотруднику Ольге Владимировне Бурлаковой за обсуждение и ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04136мк).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку материалов и написание обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пантелеев М.А., Абаева А.А., Нечипуренко Д.Ю. и др.* Физиология и патология внеклеточных везикул // Онкогематология. 2017. Т 12. № 1. С. 62–70.
- Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П.* Экзосомы: механизмы, возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. № 1. С. 163–175.
- Adamiak M., Cheng G., Bobis-Wozowicz S. et al.* Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived extracellular vesicles are safer and more effective for cardiac repair than iPSCs // *Circ. Res.* 2018. V. 122. № 2. P. 296–309.
- Alcayaga-Miranda F., Varas-Goboy M., Khoury M.* Harnessing the angiogenic potential of stem cell-derived exosomes for vascular regeneration // *Stem Cells Int.* 2016.
- Airola M., Hannun Y.* Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases // *Handb Exp. Pharmacol.* 2013. V. 215. P. 57–76.
- Anderson H.* Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage // *J. Cell Biol.* 1969. V. 41. № 1. P. 59–72.
- Battaglia R., Palini S., Vento M. et al.* Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 84. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36452-7>
- Braam S., Zeinstra L., Litjens S. et al.* Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via α v β 5 integrin // *Stem Cells.* 2008. V. 26(9). P. 2257–2265.
- Brons I., Smithers L., Trotter M. et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature.* 2007. V. 12. № 448(7150). P. 191–195.
- Capalbo A., Ubaldi F-M., Cimadomo D. et al.* MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoblast cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment // *Fertil. Steril.* 2016. V. 105. P. 225–235.
- Chen B., Sun Y., Zhang J. et al.* Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells // *Stem Cell Research & Therapy.* 2019. V. 10. P. 142. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1253-6>
- Chen Y., Lai D.* Pluripotent states of human embryonic stem cells // *Cell Reprogram.* 2015. V. 17. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0061>
- Colombo M., Moita C., Niel G. et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. № 24. P. 5553–5565.
- Cordes K., Sheehy N., White M. et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity // *Nature.* 2009. V. 460. P. 705–710.
- Coumans F., Brisson A., Buzas E.* Methodological guidelines to study extracellular vesicles // *Circ. Res.* 2017. V. 120. № 10. P. 1632–1648.
- Cufaro M., Pieragostino D., Lanuti P. et al.* Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: The contribution of proteomics // *J. Oncol.* 2019. 1639854. <https://doi.org/10.1155/2019/1639854>
- Dalton A.* Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles // *J. Natl. Cancer Inst.* 1975. V. 54. № 5. P. 1137–1148.
- Desrochers L., Bordeleau F., Reinhart-King C. et al.* Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11958. <https://doi.org/10.1038/ncomms11958>
- Ding Q., Sun R., Wang P. et al.* Protective effects of human induced pluripotent stem cell-derived exosomes on high glucose-induced injury in human endothelial cells // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 15. P. 4791.
- Dodsworth B., Hatje K., Rostovskaya M. et al.* Profiling of naive and primed human pluripotent stem cells reveals state-associated miRNAs // *Scientific Reports.* 2020. V. 10. P. 10542. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67376-w>
- Espey L., Stutts R.* Exchange of cytoplasm between cells of the membrana granulosa in rabbit ovarian follicles // *Biology of Reproduction.* 1972. V. 6. № 1. P. 168–175.
- Farber D., Katsman D.* Embryonic stem cell-derived microvesicles: could they be used for retinal regeneration? // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016. V. 854. P. 563–569.
- Greening D., Nguyen H., Elgass K. et al.* Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions // *Biol. Reprod.* 2016. V. 94. P. 38.
- Gruber A., Grandy W., Balwierz P. et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs contribute to pluripotency by inhibiting regulators of multiple differentiation pathways. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 9313–9326.
- Gyorgy B., Szabo T., Paszoti M. et al.* Membrane Vesicles, Current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 68. № 16. P. 2667–2688.
- Guescini M., Genedani S., Stocchi V. et al.* Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // *J. Neural Transm.* 2010. V. 117. P. 1–4.

- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 9222–9227.
- Hayashi Y., Furue M., Okamoto T. et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 12. P. 3005–3015.
- Henne W., Buchkovich N., Emr S. The ESCRT pathway // *Dev. Cell*. 2011. V. 21. № 1. P. 77–91.
- Ho B., Olson G., Figel S. et al. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 25. № 287(22). P. 18656–18673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322883>
- Hur Y., Cerione R., Antonyak M. Extracellular vesicles and their role in stem cell biology // *Stem. Cells*. 2020. V. 38. P. 469–476.
- Hur Y., Feng S., Wilson K. et al. Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles maintain ESC stemness by activating FAK // *Dev. Cell*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.017>
- Huotari J., Helenius A. Endosome maturation // *EMBO J*. 2011. V. 30. № 17. P. 3481–3500.
- Jae N., McEwan D., Manavski Y. et al. Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles // *FEBS Lett*. 2015. V. 589. № 20. P. 3182–3188.
- Jeske R., Bejoy J., Marzano M. et al. Human pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles: Characteristics and applications // *Tissue Engineering: Part B*. 2020. V. 26. № 2. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0252>
- Jung J., Fu X., Yang P. Exosomes generated from iPSC-derivatives: New direction for stem cell therapy in human heart diseases // *Circ. Res*. 2017. V. 120. № 2. P. 407–417.
- Kalra H., Drummen G., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. № 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Konala V., Mamidi M., Bhone R. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration // *Cytotherapy*. 2016. V. 18. № 1. P. 13–24.
- Kowal J., Tkach M., Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes // *Curr. Opin. Cell Biol*. 2014. V. 29. P. 116–125.
- Kurian N., Modi D. Extracellular vesicle mediated embryonic endometrial cross talk during implantation and in pregnancy // *J. Assist. Reprod. Genet*. 2019. V. 36. P. 189–198.
- Latifkar A., Hur Y., Sanchez J. et al. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function // *J. Cell. Sci*. 2019. V. 132. № 13. <https://doi.org/10.1242/jcs.222406>
- Li S., Lin Z., Jiang X. et al. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools // *Acta Pharmacol. Sin*. 2018. V. 39. № 4. P. 542–551.
- Madrigal M., Rao K., Riordan N. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods // *J. Transl. Med*. 2014. V. 12. P. 260.
- Marzano M., Bejoy J., Cheerathodi M. et al. Differential effects of extracellular vesicles of lineage-specific human pluripotent stem cells on the cellular behaviors of isogenic cortical spheroids // *Cells*. 2019. V. 8. P. 993. <https://doi.org/10.3390/cells8090993>
- McGough I., Vincent J.-P. Exosomes in developmental signalling // *Development*. 2016. V. 143. P. 2482–2493. <https://doi.org/10.1242/dev.126516>
- Mendell J. miRNAs roles for the miR-17-92 cluster in development and disease // *Cell*. 2008. V. 133. P. 217–222.
- Michalke W., Loewenstein W. Communication between cells of different type // *Nature*. 1971. V. 232. № 5306. P. 121–122.
- Mughees M., Chung H., Wajid S. Vesicular trafficking-related proteins as the potential therapeutic target for breast cancer // *Protoplasma*. 2020. V. 257. № 2. P. 345–352.
- Muhsin-Sharafaldine M., McLellan A. Apoptotic vesicles: deathly players in cancer-associated coagulation // *Immunol. Cell. Biol*. 2018.
- Oh M., Lee J., Kim Y. et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells ameliorate the aging of skin fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. V. 19. № 6. P. 1715. <https://doi.org/10.3390/ijms19061715>
- Povero D., Pinatel E., Leszczynska A. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles reduce hepatic stellate cell activation and liver fibrosis // *JCI Insight*. 2019. V. 5. № 4.
- Rani S., Ryan A., Griffin M. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications // *Mol. Ther*. 2015. V. 23. № 5. P. 812–823.
- Raposo G., Stahl P. Extracellular vesicles: A new communication paradigm? // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2019. V. 20. № 9. P. 509–510.
- Rashed M., Kanlikilicer P., Rodriguez-Aguayo C. et al. Exosomal miR-940 maintains SRC-mediated oncogenic activity in cancer cells: A possible role for exosomal disposal of tumor suppressor miRNAs // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 12. P. 20145–20164.
- Ratajczak J., Miekus K., Kucia M. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery // *Leukemia*. 2006. V. 20. № 5. P. 847–856.
- Rodin S., Domogatskaya A., Ström S. et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511 // *Nat. Biotechnol*. 2010. V. 28. № 6. P. 611–615.
- Santoso M., Ikeda G., Tada Y. et al. Exosomes from induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote autophagy for myocardial repair // *J. Am. Heart. Assoc*. 2020. V. 9. № 6.
- Sayed D., Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease // *Physiol. Rev*. 2011. V. 91. P. 827–887.
- Sharma P., Mesci P., Carromeu C. et al. Exosomes regulate neurogenesis and circuit assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 32. P. 16086–16094.
- Sheldon H., Heikamp E., Turley H. et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes // *Blood*. 2010.

- V. 116. P. 2385–2394.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239228>
- Sun Z., Li F., Zhou X. et al. Stem cell therapies for chronic obstructive pulmonary disease: current status of pre-clinical studies and clinical trials // *J. Thorac. Dis.* 2018. V. 10. № 2. P. 1084–1098.
<https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.46>
- Taheri B., Soleimani M., Aval S. et al. Induced pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles: A novel approach for cell-free regenerative medicine // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. № 6. P. 8455–8464.
- Terashvili M., Bosnjak J. Stem cell therapies in cardiovascular disease // *J. Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.* 2019. V. 33. № 1. P. 209–222.
- Tesar P., Chenoweth J., Brook F. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nature.* 2007. V. 12. № 448(7150). P. 196–199.
- Thakur B., Zhang H., Becker A. et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection // *Cell Res.* 2014. V. 24. P. 766–769.
- Theos A., Truschel S., Tenza D. et al. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis // *Dev. Cell.* 2006. V. 10. № 3. P. 343–354.
- Theunissen T., Powell B., Wang H. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency // *Cell. Stem. Cell.* 2014. V. 2. № 15(4). P. 471–487.
- Toya S., Wary K., Mittal M. et al. Integrin $\alpha 6\beta 1$ expressed in ESCs instructs the differentiation to endothelial cells // *Stem. Cells.* 2015. V. 33. № 6. P. 1719–1729.
- Villa-Diaz L., Kim J., Laperle A. et al. Inhibition of focal adhesion kinase signaling by integrin $\alpha 6\beta 1$ supports human pluripotent stem cell self-renewal // *Stem. Cells.* 2016. V. 34. № 7. P. 1753–1764.
- Vitillo L., Baxter M., Iskender B. et al. Integrin-associated adhesion kinase protects human embryonic stem cells from apoptosis, detachment and differentiation // *Stem. Cell. Rep.* 2016. V. 7. P. 167–176.
- Vitillo L., Kimber S. Integrin and FAK regulation of human pluripotent stem cells // *Curr. Stem. Cell. Rep.* 2017. V. 3. № 4. P. 358–365.
<https://doi.org/10.1007/s40778-017-0100-x>
- Vyas N., Walvekar A., Tate D. et al. Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 7357.
<https://doi.org/10.1038/srep0735>
- Wang Y., Zhang L., Li Y. et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium // *Int. J. Cardiol.* 2015. V. 192. № 61.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma // *Br. J. Haematol.* 1967. V. 13. № 3. P. 269–288.
- Yang L., Peng X., Li Y. et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes exosome secretion by regulating RAB35 and SNAP23 in hepatocellular carcinoma // *Mol. Cancer.* 2019. V. 3. № 1. P. 78.
- Yang X., Meng Y., Han Z. et al. Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: Full of chances and challenges // *Cell Biosci.* 2020. V. 10. № 123.
- Ye M., Ni Q., Qi H. et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells-endothelial cells promotes postnatal angiogenesis in mice bearing ischemic limbs // *Int. J. Biol. Sci.* 2019. V. 15. № 1. P. 158–168.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H. et al. Exosomes: Biogenesis, biological function and clinical potential // *Cell Biosci.* 2019. V. 15. № 9. P. 19.

Extracellular Vesicles of Pluripotent Stem Cells

E. A. Suprunenko^{1, *}, E. A. Sazonova¹, and A. V. Vasiliev^{1, 2}

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, bldg. 12, Moscow, 119234 Russia

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

*e-mail: suprunenkoe@mail.ru

The review article presents data on extracellular vesicles (EV), the bilayer phospholipid membrane structures secreted by different types of cells, containing proteins, lipids and nucleic acids. We examine the features of their structure, biogenesis, mechanisms of interaction with the recipient cell, etc. The properties of extracellular vesicles of embryonic stem cells (ESCs) and their role in the regulation of developmental processes are considered. Particular attention is paid to the vesicles of induced pluripotent stem cells (iPSCs), their role in maintaining pluripotency, as well as the specificity of cell vesicles obtained during directed iPSC differentiation.

Keywords: extracellular vesicles, pluripotent stem cells, paracrine regulators, reparation

УДК 591.3

ГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ КАК ОСНОВА ЭВОЛЮЦИОННОГО УСПЕХА ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2021 г. А. В. Байрамов^{а, *}, Г. В. Ермакова^а, А. В. Кучерявый^б, А. Г. Зарайский^а^аФедеральное государственное учреждение науки Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

^бФедеральное государственное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: andrbayr@gmail.com

Поступила в редакцию 08.12.2020 г.

После доработки 08.12.2020 г.

Принята к публикации 15.01.2021 г.

Позвоночные, часто рассматриваемые как наиболее сложно организованные представители животного мира, обладают целым рядом уникальных морфологических особенностей, обеспечивших их эволюционную устойчивость и успех. Согласно наиболее распространенной точке зрения, генетической основой этих инноваций были полногеномные дупликации, произошедшие на ранних этапах эволюции позвоночных. Одним из результатов таких дупликаций стало возникновение дополнительных копий регуляторных генов. Будучи выведенными из-под сдерживающего давления естественного отбора, эти копии получили возможность относительно свободно модифицировать свою структуру и функции, оказывая влияние на индивидуальное развитие и строение организмов. Следствием таких древних геномных дупликаций является, например, то, что около 35% генов человека представлены, как минимум, двумя гомологичными копиями. Идея о дупликациях генома на ранних этапах эволюции позвоночных была впервые выдвинута в 1970 г., однако, вопросы о количестве раундов прошедших дупликаций, их масштабе (полногеномные или локальные) и о том, на каком этапе эволюции они происходили, активно обсуждаются до сих пор. В последние годы (2018–2020 гг.) благодаря бурному развитию методов обработки больших объемов данных, получаемых в результате высокопроизводительного секвенирования геномов представителей разных групп позвоночных и их ближайших родственников, бесчерепных и оболочников, был проведен целый ряд широкоформатных сравнительных исследований, направленных на выявление групп синтении в геномах разных эволюционных линий и реконструкцию предковых хромосом. В результате были предложены несколько моделей, описывающих возможные базовые сценарии геномных дупликаций в ранней эволюции позвоночных. Параллельно активно проводятся лабораторные исследования, ориентированные на детальное изучение особенностей экспрессии и функциональных свойств отдельных семейств регуляторных генов у разных групп позвоночных. И здесь открылось много новой информации о представителях эволюционно древних животных, которые еще совсем недавно не входили в число традиционных лабораторных объектов (круглоротые, хрящевые рыбы, хрящевые ганоиды). В нашей обзорной статье мы делаем попытку рассмотреть и осмыслить современные представления о механизмах и эволюционных последствиях геномных дупликаций, а также соотнести свежие данные, полученные в ходе лабораторных исследований, с предлагаемыми на сегодняшний день моделями формирования гено типа позвоночных.

Ключевые слова: геномные дупликации, позвоночные, аллоплоидия, автоплоидия, субфункционализация, неофункционализация, круглоротые, миноги, осетровые, костистые рыбы, *Hox*, *Noggin*, *Pax*, *ParaHox*, *WGD*, *FoxP*, *CRD*

DOI: 10.31857/S0475145021030022

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразие жизненных форм и высокий уровень приспособленности живых организмов к особенностям среды обитания являются результатом эволюционных преобразований их геномов и механизмов индивидуального развития. В основе адаптации к внешним условиям и освоения но-

вых экологических ниш лежит приобретение организмами новых признаков. Вопросы появления этих признаков, их закрепления и последующих преобразований являются одними из центральных в эволюционной биологии (Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018). Геномные дупликации могут выступать в качестве фундамента, обеспечивающего

появление нового генетического материала, своего рода поставщиком “генетического сырья”, при переработке которого, в ходе последующих эволюционных изменений под воздействием естественного отбора, происходит развитие и усложнение геномов организмов как на структурном, так и на регуляторном уровнях.

Предположение о том, что полногеномные дупликации (ПГД) могут являться двигателем эволюционного прогресса, впервые было высказано в 1970 г. американским исследователем японского происхождения Сусуму Оно (Susumo Ohno) в ставшей впоследствии классической монографии “Эволюция путем дупликации генов” (Evolution by Genes Duplications, Ohno, 1970).

Полногеномные дупликации, как отражено уже в самом их названии, в отличие от локальных удвоений отдельных генов или более протяженных фрагментов генома, приводят к полиплоидии – появлению в организме двойного набора всех хромосом. Такие дупликации могут происходить вследствие нарушений редукции в мейозе или за счет митотических удвоений в родительских половых клетках или на ранних этапах развития зародыша (Van de Peer, 2009, 2017; Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018). С точки зрения эволюционных перспектив удвоившихся генов (подробно спектр возможных сценариев мы рассмотрим ниже), важным результатом ПГД является то, что они приводят к удвоению не только белок-кодирующих последовательностей (экзома организма), но и к дупликации некодирующих участков генома, содержащих регуляторные последовательности.

После ПГД полиплоидия, как правило, элиминируется, за счет того, что рано или поздно парные хромосомы накапливают критическую массу изменений, не позволяющую им оставаться квадривалентными в ходе мейоза (MacKintosh, Ferrier, 2018). В итоге, когда восстанавливается исходная парность всех имеющихся хромосом, их носитель вновь становится диплоидным, то есть происходит его ре-диплоидизация. И, хотя организмы, прошедшие ре-диплоидизацию, больше не являются полиплоидными, они, как правило, сохраняют признаки своего полиплоидного прошлого, одним из которых являются дублицированные копии отдельных генов.

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ – РЕДКО, НО МЕТКО

Полногеномных дупликаций, последствия которых закрепились и сохранились на эволюционном пути, произошло, по оценкам исследователей, не так много, и чаще они происходили у растений, чем у животных (MacKintosh, Ferrier, 2018). В качестве возможной причины этой раз-

ницы рассматривается нарушение механизма формирования половой принадлежности у двуполых животных в случае их полиплоидизации (Mable, 2004; Orr, 1990). Также отмечается, что оплодотворение одной яйцеклетки двумя сперматозоидами или мейотические нарушения имеют, как правило, летальные последствия у млекопитающих и птиц (Sahoo et al., 2017; Forstmeier et al., 2010). Подробнее современные взгляды на проблему геномных дупликаций у позвоночных мы рассмотрим ниже, здесь лишь отметим, что большинство исследователей сходится во мнении, что на ранних этапах эволюции позвоночных (около 500–600 млн лет назад) произошли одна или две ПГД, а позже дополнительные дупликации происходили у рыб: у осетровых, у общего предка костистых рыб, а в последующем и у отдельных представителей этой группы (Meyer et al., 2005; Dehal, Boore, 2005; Du et al., 2020).

Среди представителей беспозвоночных на сегодняшний день две геномные дупликации описаны у паукообразных и одна у коловраток (Flot et al., 2013; Nossa et al., 2014; Kenny et al., 2016; Schwager, 2017).

Для одноклеточных эукариот отмечается, что современные диплоидные пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а также представители пяти близких к ним родов произошли после дупликации генома их общего предка около 100 млн лет назад (Scannell, 2007).

У цветковых растений обнаружены следы четырех ПГД, произошедших ориентировочно 150–200 млн лет назад (Soltis et al., 2008, 2009).

У грибов есть свидетельства только одной ПГД (Scannell et al., 2007).

Очевидно, что сведения о дупликациях будут дополняться, но и имеющиеся данные показывают, что ПГД происходили в разные исторические периоды в самых разных группах живых организмов. С учетом рассматриваемых временных масштабов приходится признать, что успешные ПГД на эволюционном пути случались достаточно редко – это единичные события на горизонтах в десятки и сотни миллионов лет.

Бросается в глаза, что оставившие свой след ПГД происходили в таких эволюционно успешных и экологически разнообразных линиях как позвоночные животные и цветковые растения (Jaillon et al., 2004; Meyer et al., 2005; Dehal, Boore, 2005; Tang et al., 2008; Putnam et al., 2008; Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018). Возможно, что бурное эволюционное развитие и возможность освоения широкого спектра экологических ниш представителями этих групп во многом были обеспечены именно дупликациями геномов, произошедшими у их предков.

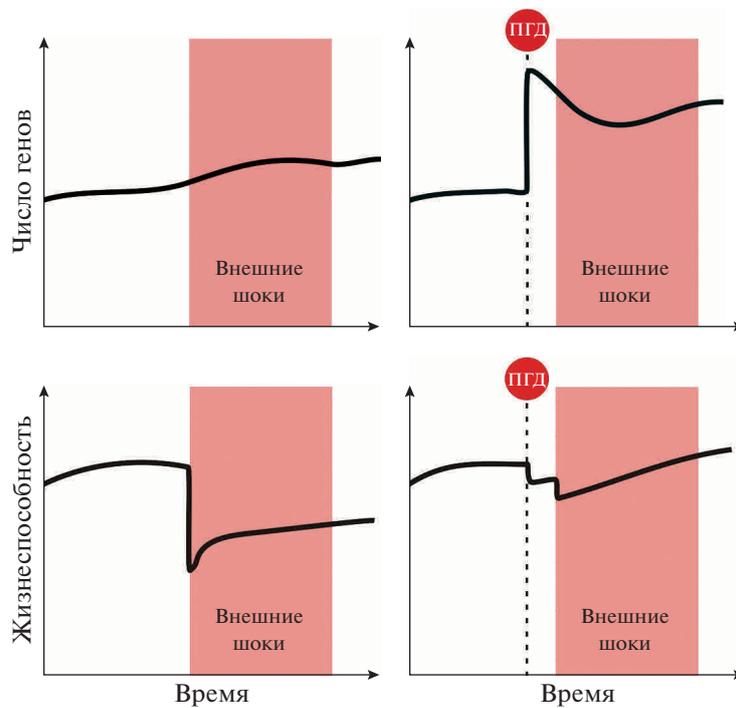


Рис. 1. Полногеномные дупликации могут влиять на устойчивость и жизнеспособность видов в периоды стрессовых изменений окружающих условий (по Van de Peer et al., 2017).

Макинтош и Ферье делают попытку выявления и описания общих черт успешных ПГД (MacKintosh, Ferrier, 2018).

Авторы отмечают, что большинство, если не все, хорошо описанные ПГД были аллоплоидными событиями (объединением в одном организме геномов разных видов), однако ПГД у костистых рыб и последующая дополнительная дупликация у лососевых описаны как автоплоидные (удвоение собственного генома вида) (Martin, Holland, 2014; Christensen, Davidson, 2017; MacKintosh, Ferrier, 2018). Возможно, имеющиеся существенные различия в родительских хромосомах при аллоплоидизации способствуют скорейшему восстановлению диплоидного статуса потомков — редиплоидизации. При автоплоидизации возврат к диплоидности имеет более растянутый во времени, градиентный характер (Otto, 2007).

Ван де Пеером отмечено, что между дупликацией и последующим всплеском видовой разнообразия часто присутствует временной лаг и эти события, как правило, сопряжены с существенными изменениями условий окружающей среды и климата. Это позволяет предположить, что полиплоидные организмы, как растения, так и животные могут быть более устойчивы в стрессовые периоды (рис. 1, Van de Peer et al., 2017). Некоторые ПГД у покрытосеменных датированы границей мелового периода и палеогена (так называемое, мел-палеогеновое вымирание около

66 млн лет назад), а дупликация у лососевых, произошедшая 88 млн лет назад, впоследствии привела к развитию способности этих рыб мигрировать между пресными и морскими водами после похолодания на границе эоцена и олигоцена (Vanneste et al., 2014; Macqueen, Johnston, 2014).

Оценить точное число генов, кодирующих белки даже при наличии качественно отсекуемого генома сложно. Это связано с трудностями распознавания генов, кодирующих короткие пептидные последовательности, выявления нефункциональных псевдогенов и сборки участков хромосом, содержащих повторы и дупликации (Holland et al., 2016). Даже у эволюционно близких видов количество предполагаемых генов может различаться: согласно данным NCBI, актуальный список белок-кодирующих генов у человека *Homo sapiens* насчитывает 19116 генов, у мыши *Mus musculus* — 23051 ген, а в целом у позвоночных число генов оценивается в диапазоне от 16 до 26 тысяч (Holland et al., 2016; Piovestan et al., 2019; http://www.informatics.jax.org/mgihome/homepages/stats/all_stats.shtml). При рассмотрении более далеких групп разброс еще больше возрастает: у оболочника *Ciona intestinalis* — 13648 генов; у дрозофилы *Drosophila melanogaster* — 13919; у нематоды *Caenorhabditis elegans* — 20269.

Наблюдаемое у организма количество генов представляет собой точку динамического равновесия между непрерывными процессами их появ-

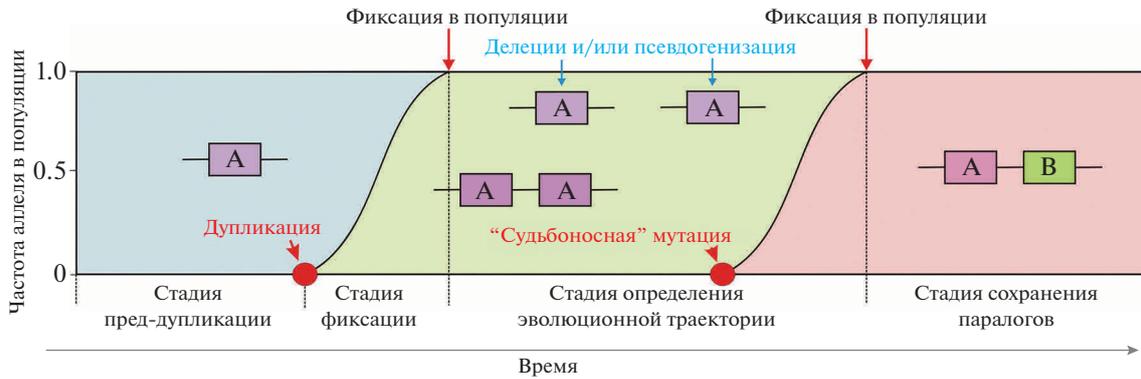


Рис. 2. Схема появления и фиксации дублицированных генов в популяции (по Innan, Kondrashov, 2010).

ления и исчезновения. К сегодняшнему дню описаны возможности появления новых генов вследствие полногеномных, хромосомных, тандемных, локальных дубликаций, ретропозиций и комбинации копирования экзонов с последующим *de novo* включением некодирующих последовательностей в сочетании с мобильными элементами (Holland et al., 2016). Исследования показывают, что менее 1% генов человека произошли в результате ретро-транспозиции (Pan, Zhang, 2009; Ciomborowska et al., 2013).

ПГД, как правило, сопровождаются последующей масштабной утратой генов, по отдельным оценкам достигающей 85% дублицированных копий (Brunet et al., 2006). В то же время сама по себе «столь удручающая» статистика «выживаемости» генов после ПГД не свидетельствует о незначительности вклада этих дубликаций в судьбу организмов. Детальное сопоставление показывает, что в среднем у позвоночных, прошедших через ПГД, обнаруживается большее число генов, чем у их ближайших беспозвоночных родственников, и это обогащение функционально не равномерно. Оказывается, что по сравнению с ланцетником *Branchiostoma floridae*, геном позвоночных обогащен генами транскрипционных факторов и генами, вовлеченными в развитие нервной системы (Putnam et al., 2008). Таким образом, даже если дубликации и последующая редукция не приводят к кратному возрастанию общего числа генов, эти события могут обогащать отдельные подмножества генов участвующих в развитии определенных структур и особенностей организмов (Brunet et al., 2006).

Предполагается, что основной вклад в увеличение разброса между группами по числу генов вносят локальные дубликации. Описан целый ряд случаев увеличения числа генов у отдельных животных, связанный с особенностями их структуры, физиологии и поведенческими паттернами. Например, у пчел *Apis mellifera* увеличено количество генов обонятельных рецепторов (Robertson,

Wanner, 2006), у стрекоз — генов опсина, связанных с остротой зрения (Futahashi et al., 2015), у устриц *Crassostrea gigas* — генов, кодирующих белки теплового шока и экспрессирующихся во время стресса при отливах (Zhang et al., 2012). Среди головоногих моллюсков у осьминога *Octopus bimaculoides* обнаружена экспансия генов, кодирующих протокадгерин и генов, кодирующих транскрипционные факторы C2H2, участвующие в нейральном развитии (Albertin et al., 2015).

ГЕНЫ НА РАСПУТЬЕ — ЕСТЬ ЛИ ЖИЗНЬ ПОСЛЕ ДУПЛИКАЦИЙ?

Каждое генетическое изменение, на своем пути от появления к эволюционному сохранению проходит три основных этапа: 1) происхождение (появление мутации), 2) фаза фиксации, когда изменение распространяется в популяции, и 3) фаза сохранения, когда фиксированное изменение сохраняется и поддерживается в популяции. Особенностью дубликаций в рамках этой траектории является возможность возникновения генетических различий между двумя появившимися копиями, что может привести к сохранению их обеих. И, судя по всему, как раз эта фаза установления различий между копиями является определяющей для их дальнейшей эволюционной траектории или, как говорят, «судьбоносной» (от английского «fate-determining stage») (рис. 2, Innan, Kondrashov, 2010).

Копии генов, появившиеся в результате ПГД, были названы онологами, в честь японского исследователя Сусумо Оно.

В своей классической модели, положившей начало теоретическому обсуждению проблемы дубликации генов, С. Оно предположил, что наиболее вероятный постдубликационный сценарий — потеря функциональности одной из дочерних копий за ненадобностью, или нефункционализация (Ohno, 1970). Сразу после ПГД дочерние аллели предкового гена идентичны, а

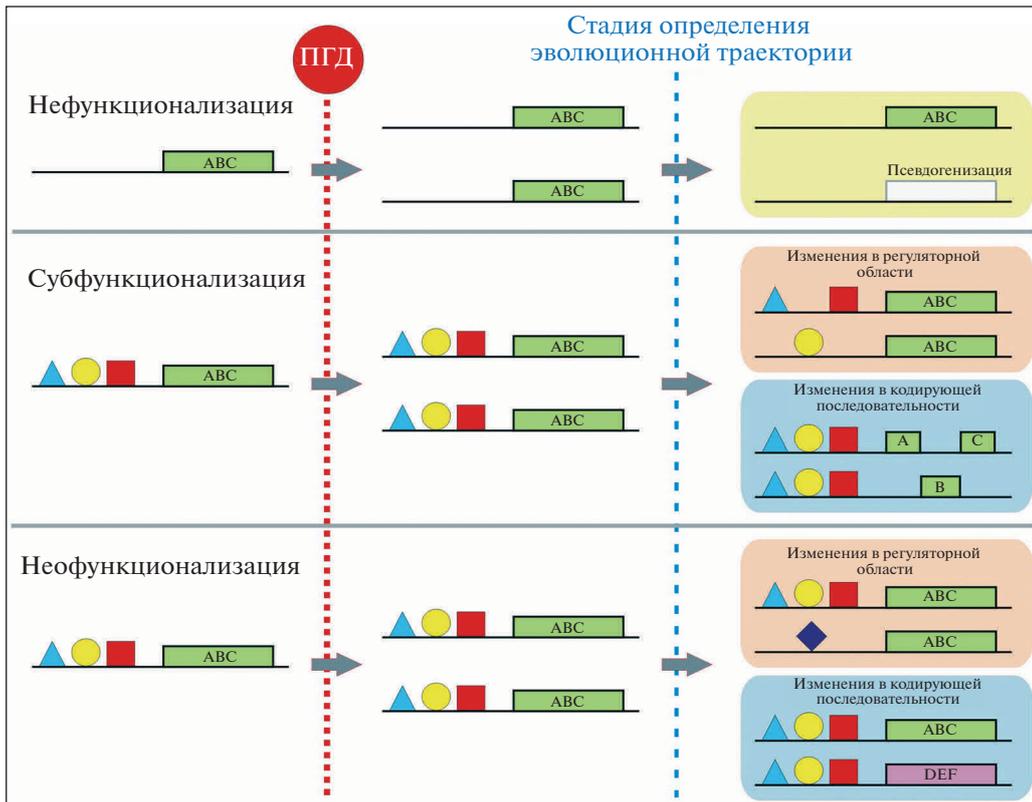


Рис. 3. Варианты эволюционных траекторий дублированных генов (по Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018).

значит функционально избыточны, поскольку для поддержания функции материнского гена достаточно и одной копии. В силу этого, давление естественного отбора на поддержание обеих копий оказывается низким (Nei, 1969; Ohno, 1970). Исходя из предположения, что вредные мутации случаются гораздо чаще полезных (ломать – не строить!), они неизбежно будут накапливаться в кодирующей области одного из дубликатов и рано или поздно приведут к потере ее функциональности. В результате функциональный в прошлом ген становится псевдогеном, поэтому этот процесс также называют псевдогенизацией (рис. 3, Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018). Ряд экспериментальных исследований действительно подтвердил, что нефункционализация является наиболее распространенным сценарием эволюции дублированных генов (Kimura, King, 1979; Li, 1980; Stoltzfus, 1999; Jaillon et al., 2004; Woods et al., 2005; Brunet et al., 2006). Исследования семейств генов после геномной дубликации костистых рыб (ПГДКР – полногеномная дубликация костистых рыб, “калька” с принятой англоязычной аббревиатуры “TS-WGD” – Teleostei-specific Whole Genome Duplication) свидетельствуют о сохранении у рыб *Danio rerio* около 20% дублированных генов, что рассматривается в качестве максимальной (!) оценки степени сохранности дублициро-

ванных генов после этой полногеномной дубликации (Postlethwait et al., 2000, 2004; Woods et al., 2005).

В то же время, С. Оно предположил, что в редких случаях накопленные дополнительные замены могут быть полезными и приводить к обретению новой функции гена, которая будет поддерживаться отбором.

В предложенной модели, однако, не вполне ясно, каким образом естественный отбор может различать новую и исходную копии генов, а ведь для них предполагается разная скорость изменений: быстрое накопление мутаций в свободном от давления отбора “дубликаты” и стабильность в “оригинале”, продолжающем выполнять материнскую функцию под давлением отбора (Innan, Kondrashov, 2010).

Для разрешения этого противоречия, в русле развития идей С. Оно, Форс с коллегами предложили модель, получившую название дубликация-вырождение-дополнение (DDC от Duplication–Degeneration–Complementation) (Force et al., 1999). Поскольку, как правило, гены выполняют не одну, а несколько функций, которые при этом могут по-разному проявляться в различных типах клеток на разных стадиях, эти функции или области активности предкового гена могут быть разделены между его дочерними копиями (Glasauer,

Neuhauss, 2014). Согласно предложенной модели, мутации могут накапливаться в обеих дочерних (или по отношению друг к другу – сестринских) копиях, снижая их функциональную эффективность. В результате каждая из копий по отдельности оказывается недостаточной для выполнения функции материнского гена и тогда сохранение обоих паралогов может поддерживаться отбором (Force et al., 1999; Lynch, Force, 2000; Lynch et al., 2001). Такое разделение труда между сестринскими копиями может быть связано с изменениями в регуляторных участках и в этом случае оно будет отражаться в изменениях паттернов экспрессии и разделении области экспрессии материнского гена между дочерними копиями. Это называют регуляторной субфункционализацией (рис. 3, Joyner et al., 1987; Woolfe, Elgar, 2007). Примером, иллюстрирующим такой сценарий, может служить экспрессия двух паралогов гена *Engrailed1* – *En1a* и *En1b* у рыбы *D. rerio*. Ген *En1a* экспрессируется в зачатках грудных плавников, в то время как *En1b* – в нейронах заднего и спинного мозга (Force et al., 1999). При этом единственный ген *En1* обнаруженный у мышей экспрессируется как в зачатках передних конечностей, так и в области заднего и спинного мозга (Joyner, Martin, 1987; Davis et al., 1991). Если мутационные изменения происходят в белок-кодирующей последовательности гена, они могут привести к распределению между дочерними копиями функциональных свойств предкового гена (рис. 3, Innan, Kondrashov, 2010).

Еще один из возможных путей субфункционализации был предложен Хьюзом в 1994 г., а позже назван Де Марэ и Раушером “уходом от адаптивного конфликта” (EAC – *Escape from Adaptive Control*) (Hughes, 1994; DesMarais, Rausher, 2008). Эта модель рассматривает ситуацию, когда ген имеет две функции, которые конкурируют между собой и, в силу этого не могут быть одновременно оптимизированы (улучшение одной из функций приводит к ухудшению другой). В этом случае дупликация снимает имеющиеся ограничения и каждый из паралогов получает возможность специализироваться на одной из функций предкового гена, развивая и оптимизируя именно ее. Предполагается, что такой механизм скорее может реализовываться для генов, которые не являются критически важными для выживания, но могут повышать приспособленность организма (Sikosek et al., 2012). Изначально эта модель была предложена в качестве теоретической, однако впоследствии был описан ряд примеров ее реализации в природе (DesMarais, Rausher, 2008; Deng et al., 2010; Huang et al., 2012; Glasauer, Neuhauss, 2014).

Возможность обретения геном новой функции после дупликации, или неофункционализации, впервые так же была высказана С. Оно (Ohno,

1970). Этот механизм еще называют моделью “мутации при нефункциональности” (MDN-mutation during non-functionality) (Hughes, 1994; Conant, Wolfe, 2008). Название отражает основную идею – один из паралогов продолжает поддерживать функцию предкового гена, в то время как второй, будучи свободным от функциональных обязательств, может свободно меняться. В данном случае, в отличие от описанных выше моделей, предполагается появление в мутирующем паралоге “полезной” мутации, придающей ему возможность выполнения новой функции (рис. 3). Поскольку такие мутации происходят редко, этот сценарий считается маловероятным по сравнению с не- или субфункционализацией (Glasauer, Neuhauss, 2014). В то же время, поскольку в данном случае происходит появление новой функции, именно этот сценарий рассматривается как потенциальный механизм появления новых признаков в эволюции.

Как и в случае субфункционализации, мутация может происходить в регуляторной (чаще) или кодирующей (реже) последовательностях (Braasch et al., 2006; Douard et al., 2008; Kassahn et al., 2009). Показано, что изменения паттернов экспрессии вследствие мутаций в регуляторной области могут приводить к морфологическим изменениям на эволюционном пути (Guerreiro et al., 2013; Vuolo et al., 2016; Moriyama, Koshiba-Takeushi, 2018).

Другим механизмом, обеспечивающим сохранение обоих паралогов может быть так называемый “эффект дозирования”. Если возрастание уровня экспрессии гена выгодно, его дупликация будет поддерживаться естественным отбором. Считается, что эта модель применима к трем группам генов. В первую очередь – к генам, участвующим в обеспечении взаимодействия организма с внешней средой, генам, регулирующим ответ на стрессы, генам, выполняющим сенсорные и транспортные функции и к генам, связанным с метаболизмом (Kondrashov et al., 2002). Во вторую очередь – к генам, эффективность которых зависит от концентрации (Kondrashov et al., 2004; Veitia et al., 2005). И, наконец, к генам, которые всегда нужны в клетке в больших количествах, например, кодирующих рибосомные белки и гистоны (Kondrashov et al., 2002; Sugino, 2006).

Согласно гипотезе геномного баланса, в регуляторных сетях и каскадах важно сохранение определенного соотношения уровней экспрессии участвующих в них генов. Необходимость соблюдения этого условия может приводить к сценариям, в которых после дупликаций все гены определенного сигнального каскада остаются дублированными для поддержания его функционирования (Conant, Wolfe, 2007). Поскольку ПГД приводят к удвоению всего генома, сами по себе они не приво-

дят к концентрационным дисбалансам, в то время как дубликации отдельных генов могут имеющийся баланс нарушать. В подтверждение этой идеи и у растений, и у животных было показано, что паралоги генов, функционально тесно связанных между собой, например, генов, участвующих в транскрипционных и сигнальных каскадах, или кодирующих белки, активно включенные в межбелковые взаимодействия, имеют тенденцию к сохранению дублицированных копий после ПГД, но не после локальных дубликаций (Blomme et al., 2006; Freeling, 2008; Hufton et al., 2009).

Приходится отметить, что иногда идентификация дублицированных генов может быть затруднена в силу характера и масштаба произошедших в них изменений. Согласно базовой модели, появившиеся в результате дубликации два сестринских аллеля будут равноудалены от предкового гена и оба будут ортологами недублицированных генов других групп (Sharman, 1999; Holland, 1999). В ходе эволюции дублицированные гены будут меняться, накапливая изменения, уникальные для каждой из копий. Если скорость изменчивости обоих генов сопоставима (абсолютно идентичной она в любом случае не будет), можно говорить о симметричной дивергенции. Подобная картина наблюдается, например, для четырех кластеров *Hox*-генов млекопитающих, ортологичных единственному *Hox*-кластеру ланцетника и сопоставимо равноудаленных от него. Вдобавок все они унаследовали от предковых генов общие черты экспрессии в центральной нервной системе, дополняемые различающимися паттернами в других тканях — соматической и висцеральной мезодерме (Holland et al., 2016). Аналогично, три гена *Cdx* шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis* ортологичные единственному *Cdx* гену ланцетника, имеют общие с ним функциональные черты (Faas, Isaaks, 2009). Однако, кроме подобной симметричной дивергенции может наблюдаться и крайне неравномерное накопление изменений у дочерних копий, когда один из аллелей изменяется быстрее другого, и в этом случае говорят об асимметричной дивергенции. Примеры такого сценария после ПГД также были описаны у позвоночных. Было показано, что ген *Crx* является ортологом генов *Otx1* и *Otx2* млекопитающих. Это удалось установить путем сопоставления расположения трех генов в хромосомах, при том, что по характеру экспрессии ген *Crx*, экспрессирующийся в глазной сетчатке, отличается как от *Otx1* и *Otx2*, так и от ортологов у беспозвоночных — *Otx* ланцетника и *otd* дрозофилы (Plouhines et al., 2003). Похожая ситуация описана и для гена *Pax6*, который активно изучался у позвоночных и беспозвоночных в качестве одного из ключевых ранних регуляторов нормального развития зрительных структур (Quiring et al., 1994). Как и в случае с генами *Otx*, только сравнительно недавно, благо-

даря анализу хромосомного расположения было установлено, что ген *Pax4* является паралогом гена *Pax6*. За время своей эволюции, в отличие от *Pax6*, последовательность и регуляторная область гена *Pax4*, участвующего в развитии печени у позвоночных, сильно изменились (Matsushita et al., 1998). Изменения нуклеотидной последовательности *Pax4* настолько существенные, что при филогенетическом анализе для него не обнаруживаются гомологов у беспозвоночных и на филогенетическом дереве формально он выглядит как новый ген позвоночных, хотя в действительности является паралогом *Pax6* (Holland et al., 2016).

ПОЗВОНОЧНЫЕ — ТРИУМФ ИННОВАТОРОВ

Эволюционным инновациям трудно дать строгое определение, но, как правило, под ними подразумевают качественно новые адаптивные особенности организмов. Зачастую они представляют собой основу, на базе которой могут развиваться последующие эволюционные изменения. Так, развитие зрительной системы, появление цветка или возможности полета, открыли перед их носителями возможности освоения новых экологических ниш. При этом, как отмечал еще в 1905 г. один из пионеров исследований полиплоидии генетик Хьюго де Фриз “естественный отбор может объяснить *выживание* наиболее приспособленных, но он не может объяснить *появление* наиболее приспособленных” (de Vries, 1905). Последующее развитие биологии показало, что все фенотипические инновации в итоге имеют молекулярную основу. Они являются результатом генетических изменений, влияющих на биологическую функцию и регуляцию активности как отдельных биологических макромолекул, так и на образуемых этими макромолекулами сетей взаимодействия (Wagner, 2011).

План строения позвоночных можно рассматривать как цельную мозаику, состоящую из филогенетически взаимосвязанных составляющих. Одни могут быть прослежены на глубину общего предка позвоночных или даже всех вторичноротых, и послужили основой для формирования характерных черт современных групп (York, McCauley, 2020). Другие не имеют очевидных предшественников у вымерших или ныне живущих представителей беспозвоночных (Lowe et al., 2015; Satoh, 2016).

Список морфологических особенностей позвоночных внушителен и среди наиболее общепризнанных нужно упомянуть: развитый головной мозг, состоящий из трех основных отделов, включая уникальный для позвоночных конечный мозг, сложно устроенную периферическую нервную систему с парными сенсорными органами, внутреннее ухо с вестибулярным аппаратом и полукруглыми каналами, мышечный дыхательный

аппарат, череп, сформированный хрящевой и/или костной тканью; наджаберную, поджаберную и глазную мускулатуры; многокамерное сердце с сердечной мускулатурой; глоточные артерии с эндотелием; сегментированную систему почечной фильтрации (Janvier, 2003; Gee, 2018; York, McCauley, 2020).

Одной из ярких особенностей позвоночных является то, что многие их морфологические инновации развиваются при непосредственном участии одной популяции эмбриональных клеток – клеток нервного гребня (КНГ) (Sauka-Spengler et al., 2007; Hall, 2008; Trainor, 2013). Иногда эту клеточную популяцию даже называют четвертым зародышевым листком, по аналогии и в дополнение к трем классическим типами зародышевых тканей – эктодерме, мезодерме и энтодерме.

Нервный гребень уникален для позвоночных, и он представляет собой популяцию мигрирующих стволовых клеток, дающих начало множеству внешне разнородных структур и черт, во многом и определяющих строение и облик позвоночных. В числе производных нервного гребня можно назвать значительную часть периферической нервной системы, пигментные клетки, элементы сердца и зубов, а также, так называемую, “новую голову” позвоночных – хрящевые и костные структуры формирующие черепно-лицевой скелет (Gans, Northcutt, 1983; Northcutt, 2005; Green et al., 2015). У челюстноротых скелет головы дополняется челюстными структурами, несущими ряды зубов (Northcutt, 1983; Kuratani, 2004; Northcutt, 2005; Gans, Green et al., 2015; Brazeau, Friedman, 2015; Miyashita, 2016).

Все эти инновации, включающие развитие нервной и сенсорной, дыхательной и кровеносной систем, скелета и мускулатуры позволили ранним позвоночным перейти к более активным образу жизни и питания и, в итоге, освоить новые места обитания и экологические ниши (York, McCauley, 2020). Ряд исследований показывает, что и в наши дни КНГ продолжают участвовать в непрерывной морфологической эволюции современных видов, например, у домашних животных (Wilkins et al., 2014; Prescott et al., 2015; Sánchez-Villagra et al., 2016). Это свидетельствует о том, что КНГ не только участвуют в формировании многих уже состоявшихся структур позвоночных, но и остаются источником развития новых признаков и особенностей животных (York, McCauley, 2020).

Значительная часть наших знаний об эмбриональном развитии позвоночных получена в работе с традиционными модельными объектами, такими как зародыши мышей, кур, рыб, шпорцевых лягушек (Gilbert, 2006).

Достоинствами этих объектов являются: возможность получения живых зародышей для проведения экспериментов практически в любое время года, возможность создания генетических линий, возможность применения имеющихся лабораторных методик и подходов, детально разработанные протоколы для работы и содержания как эмбрионов, так и взрослых особей в лабораторных условиях, качественно отсекаемые и проанализированные геномы и транскриптомы. Эти особенности, безусловно, играют важную роль для успешного проведения функциональных экспериментов. В то же время, для исследования эволюционной истории позвоночных особую ценность приобретают исследования так называемых “немодельных” объектов. Не обладая набором качеств, делающих их удобными для комфортной лабораторной работы, эти животные, однако, занимают важные филогенетические узлы на эволюционном пути позвоночных, что объясняет возрастающий в последние годы интерес к их исследованиям. К таким объектам можно отнести представителей хрящевых и лучеперых рыб, а также бесчелюстных (Dahn et al., 2007; Ota, Kuratani, 2007; Oisi et al., 2007, 2013; Green, Bronner, 2014; Braasch et al., 2015; McCauley et al., 2015; Pasquier et al., 2017). Исследования хрящевых рыб могут помочь ответить на вопросы появления и эволюции кожного скелета и появления парных плавников. Архаичные представители лучеперых, такие как осетровые рыбы и панцирная щука – вопросы трансформации плавников в конечности и эволюции сенсорных органов (York, McCauley, 2020). В своей монографии С. Оно отдельно акцентировал контринтуитивный тезис о том, что структуры более эволюционно продвинутых животных, как правило, берут свое начало от базовых, а не от продвинутых представителей предковой группы. В связи с этим, автор предлагает понимать термин “примитивный” как “незафиксированный и обобщенный”, а “продвинутый” – как “специализированный” (Ohno, 1970).

В рамках исследований истории и механизмов формирования генотипа позвоночных путем геномных дупликаций упомянутые представители рыб интересны тем, что у осетровых обнаружена полиплоидия, а панцирная щука, напротив, отделилась от общего ствола современных костистых рыб до произошедшей у предка этой группы ПГД (Sacerdot et al., 2018; Du et al., 2020).

Круглоротые, в контексте исследования вопросов ранней эволюционной истории позвоночных, заслуживают отдельного рассмотрения.

КРУГЛОРОТЫЕ – ТЕНИ ЗАБЫТЫХ ПРЕДКОВ

В силу своего филогенетического положения, круглоротые, отделившиеся от общего ствола на

самых ранних этапах эволюции позвоночных являются очень удачным модельным объектом для исследования происхождения позвоночных и их уникальных особенностей (Shimeld, Donoghue, 2012). Современные круглоротые включают в себя миног и миксин, значительно отличающихся между собой по внешнему виду и образу жизни (Bayramov, 2018). В связи с этим, филогенетическое родство между миногами, миксинами и челюстноротыми долгое время оставалось предметом дискуссий. Одна гипотеза предполагала, что сестринскими группами являются миноги и челюстноротые, а миксины рассматривались в качестве внешней группы (парафилетическое происхождение круглоротых). Ей противостоял взгляд на круглоротых, как на единую группу монофилетического происхождения, в полном составе сестринскую челюстноротым (Janvier, 1996; Heimberg et al., 2010). В последнее время более уверенное подтверждение получила вторая гипотеза об эволюционном единстве современных круглоротых, произошедших от разнообразной группы бесчелюстных рыб — одних из первых представителей позвоночных, появившихся около 500 млн лет назад (Janvier, 2015; Onimaru, Kuraku, 2018; York, McCauley, 2020). К сожалению, миноги и миксины являются единственными ныне живущими представителями этой группы, а остальные бесчелюстные, как и переходные формы от бесчелюстных к челюстноротым, вымерли около 300 млн лет назад (Donoghue, Purnell, 2005; Donoghue, Keating, 2014). Являясь сестринской для челюстноротых группой, современные круглоротые занимают важное филогенетическое положение, позволяя путем сравнительного анализа их строения со строением челюстноротых реконструировать черты общего предка позвоночных. При том, что с эволюционной точки зрения, миноги и миксины в равной степени интересны для исследования базовых черт позвоночных, в лабораторных условиях миноги, при всех имеющихся технических ограничениях, все же имеют существенное преимущество перед миксинами. Взрослые особи миксин труднодоступны, поскольку живут и нерестятся на больших глубинах, зародыши развиваются несколько месяцев и для содержания этих животных требуются специальные лабораторные условия (Ota et al., 2007; Kuratani, Ota, 2008; Shimeld, Donoghue, 2012). Работа Оты и коллег, описывающая развитие нервного гребня у миксины — пиявкорота Бургера *Eptatretus burgeri*, опубликованная в 2007 г., стала первым исследованием развития миксин за более чем 100 лет (Ota et al., 2007). Миноги же являются наиболее доступными для исследований представителей круглоротых (Bayramov et al., 2018).

Попытки реконструкции облика и строения общего предка позвоночных неизбежно сталкиваются с рядом трудностей, таких как отсутствие надежных внешних групп для современных по-

звоночных и недостаток информации о филогенетически важных древних представителях круглоротых, в силу своего строения плохо сохраняющихся в палеонтологической летописи (Onimaru, Kuraku, 2018).

Ближайшими родственниками позвоночных являются бесчерепные (ланцетники) и оболочники (асцидии), которые по своему строению сильно отличаются от позвоночных. Внутри эволюционной линии позвоночных круглоротые традиционно рассматриваются в качестве внешней группы по отношению к челюстноротым, однако нельзя исключать, что отдельные морфологические особенности их современных представителей — миног и миксин — имеют вторичное происхождение. Эти обстоятельства снижают надежность применения традиционных филогенетических методов, основанных на анализе синапоморфий (общих признаков предковой и дочерних групп) и придерживающихся принципа максимальной парсимонии (экономности числа событий).

Масштабная работа Кураку и коллег, включавшая анализ 55 семейств генов позвоночных, как и ряд последующих исследований, свидетельствовали в пользу гипотезы о двух общих для всех позвоночных раундах полногеномной дубликации их общего предка (Kuraku et al., 2009; Lagman et al., 2013; Campanini et al., 2015; Gutierrez-Mazariegos et al., 2016). В то же время, при работе с бесчелюстными, исследователи неизбежно обращали внимание, что при анализе филогении и построении филогенетических деревьев, гены бесчелюстных зачастую уверенней группируются друг с другом, чем с ортологами челюстноротых. При этом общее число генов у бесчелюстных и челюстноротых часто совпадает (Qui et al., 2011). Для понимания этого феномена был проведен анализ гомеобоксных генов *Emx*, для которых была ранее установлена дубликация в линии миног (Tank et al., 2009). Было показано, что столь часто наблюдаемая кластеризация множественных миножьих генов может быть связана со вторичными изменениями их последовательностей, происходящими независимо у разных паралогов (Noro et al., 2015). Эта особенность генов миног даже получила название “миножий диалект” (Manousaki et al., 2011; Smith et al., 2013).

Для реконструкции предкового фенотипа позвоночных был предложен подход, основанный на установлении паттернов экспрессии генов до полногеномных дубликаций — метод хронологической реконструкции функции онологов (CHROF от *chronological reconstruction of ohnolog functions*) (Onimaru, Kuraku, 2018). Этот подход позволяет восстановить паттерн экспрессии предкового гена опираясь на паттерны его дочерних генов, прошедших путь субфункционализации. Предполагается, что регуляторная субфункционализация

онологов после ПГД отражается в сходстве паттернов их экспрессии. В основе субфункционализации, согласно упоминавшейся выше модели дупликации-вырождения-дополнения, лежат комплексные изменения регуляторных элементов онологов. На основе анализа паттернов онологов реконструируется эволюционный путь их паттернов и паттерн предкового гена. Если наблюдается сходство экспрессии онологов в определенной морфологической структуре у нескольких современных видов, история этой структуры может быть прослежена до этапа, предшествующего появлению современных онологов в результате ПГД. Примером подобной реконструкции может выступать анализ паттернов экспрессии генов *Pax2*, *Pax5* и *Pax8*, появившихся в результате двух раундов ПГД (Kozmik, 1999; Bassham et al., 2008; Goode, Elgar, 2009). У мышей эти гены экспрессируются на границе среднего и заднего мозга, а *Pax2* и *Pax8* также экспрессируются в пронефросе. У миног наблюдается экспрессия *Pax2* в тех же структурах (McCauley, Bronner-Fraser, 2002), что позволяет предположить наличие у предкового позвоночного наличие структур гомологичных границе среднего и заднего отделов мозга и пронефроса, с экспрессией в них гомолога *Pax2/5/8*. В поддержку этой гипотезы говорит то, что экспрессия гена *Pax2/5/8* у ланцетника имеет сходства с экспрессией гомологов у позвоночных (Holland, 2013). Такой же подход был применен к анализу экспрессии генов *Tbx5* и *Tbx4* в передних и задних парных конечностях позвоночных регулируемых специфическими для каждого вида конечности энхансерами (Menke et al., 2008; Minguillon et al., 2012; Adachi et al., 2016). Предполагается, что предковый ген *Tbx4/5* экспрессировался в единственной паре конечностей предкового позвоночного, а после дупликации произошла субфункционализация дочерних генов со специализацией каждого из них на экспрессии в отдельной паре конечностей. Остается, правда, открытым вопрос являлась ли эта субфункционализация причиной или следствием появления у потомков двух пар конечностей (Ruvinsky, Gibson-Brown, 2000). К сожалению, палеонтологические исследования ранних позвоночных метасприггины *Metaspriggina walcotti* и хайкоуихтиса *Haikouichthis ercaicunensis*, живших до разделения бесчелюстных и челюстноротых пока не обнаружили у них следов парных конечностей (Shu et al., 1999; Shu et al., 2003; Zhang, Hou, 2004; Morris et al., 2014). В то же время у ряда ранних представителей бесчелюстных, таких как *Euphaneropidae*, анаспиды *Anaspida*, телодонты *Thelodonti* и щитковые *Ostracodermi* описаны парные плавники, хотя их гомология с конечностями челюстноротых небесспорна, и является предметом дискуссий (Ruvinsky, Gibson-Brown, 2000; Coates et al., 2003; Sansom et al., 2010, 2013).

Уязвимостью предложенного подхода является принимаемое в нем допущение, что субфункционализация является более распространенным явлением, чем неофункционализация, по крайней мере, предложенный алгоритм позволяет реконструировать предковые паттерны только в этом случае. Также при отождествлении морфологической эволюции с изменениями паттернов экспрессии генов не учитывается возможность того, что новая структура может появиться не вследствие появления новых, а путем перераспределения активности уже имевшихся у организма генов, их функционального переключения. В целом авторы предлагаемого подхода выражают надежду, что его применение позволит найти эволюционные корни многих уникальных структур позвоночных у ранних представителей группы (Onimaru, Kuraku, 2018).

HOX-ГЕНЫ – НА ПЛЕЧАХ ГИГАНТОВ

Исторически, импульсом к появлению гипотезы о полногеномных дупликациях у позвоночных во многом послужило описание и исследование *Hox*-генов, которые представляют собой семейство высококонсервативных гомеобоксных генов обнаруженных в геномах многих групп животных. Они кодируют транскрипционные факторы, участвующие в дифференцировке вдоль передне-задней оси тела (Graham et al., 1989; Carroll, 1995). В геноме *Hox*-гены сгруппированы в кластеры. У млекопитающих описано четыре паралогичных *Hox*-кластера, которые возникли в результате дупликаций от общего предкового кластера на ранних этапах эволюции позвоночных (рис. 4, Duboule, Dolle, 1989; Pascual-Anaya et al., 2013; Parker, Krumlauf, 2017). В отдельных линиях позвоночных можно наблюдать как дополнительные дупликации, так и частичные утраты *Hox*-генов (Kuraku, Meyer, 2009; Pascual-Anaya et al., 2013). На основе сходства последовательностей и положения в кластерах *Hox*-гены позвоночных подразделяются на 14 групп паралогов (ГП) (Krumlauf, 1994). Яркой особенностью *Hox*-кластеров позвоночных является их коллинеарность – в ходе онтогенеза пространственно-временная экспрессия *Hox*-генов вдоль передне-задней оси коррелирует с их расположением в кластере. При этом ориентация (расположение 5' и 3' концов) у всех генов в кластере совпадает. Первыми экспрессируются антериорные гены, относящиеся к ГП1 и расположенные на 3' конце кластера, то есть коллинеарность носит как временной, так и пространственный характер (Duboule, Dolle, 1989; Kmita, Duboule, 2003; Duboule, 2007). Это проявляется в наблюдаемом наборе экспрессионных доменов *Hox*-генов, иногда называемой *Hox*-кодом, который отражает особенности стратификации раз-

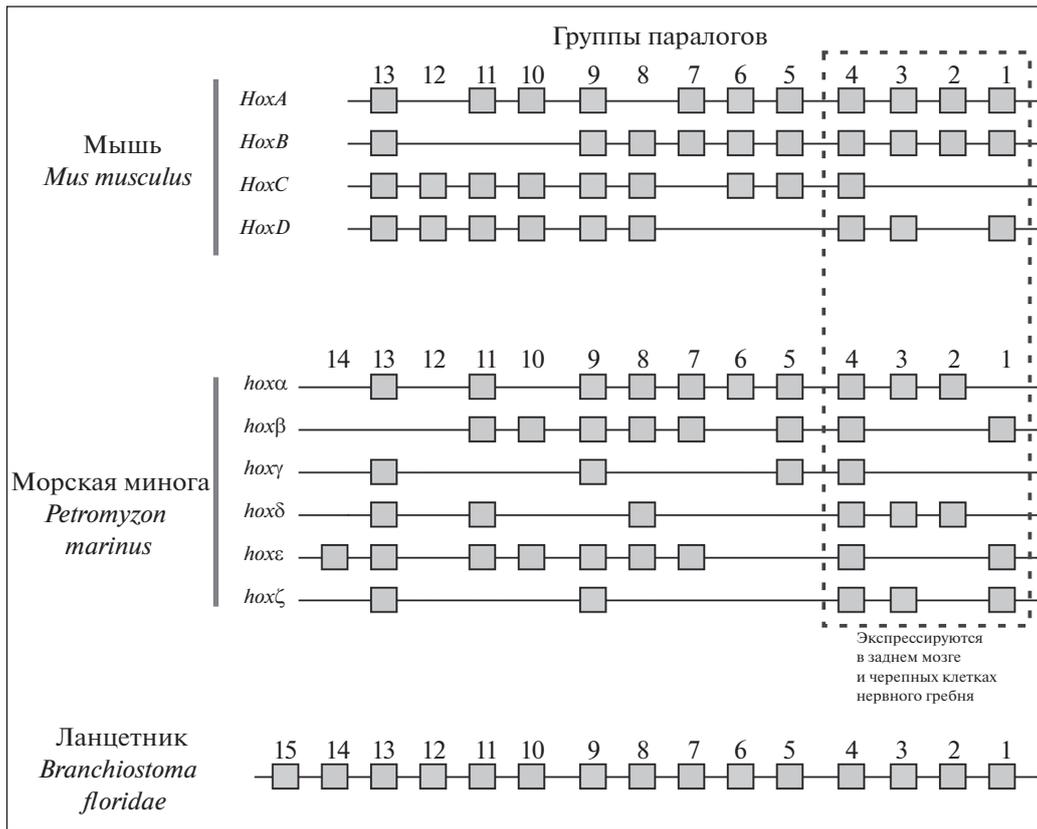


Рис. 4. Кластеры Нох-генов, обнаруженные у ланцетника, миног и млекопитающих (по Parker et al., 2019a).

ных тканей зародыша вдоль передне-задней оси тела (Mallo et al., 2010).

Нох-гены связаны с модуляцией регуляторных сигналов в заднем отделе мозга и клетках нервного гребня. Задний мозг позвоночных имеет выраженную сегментную структуру, включающую 7–8 ромбомеров и влияющую на дифференцировку черепно-лицевых структур через КНГ, мигрирующие из нервной трубки в жаберные дуги. Как показали функциональные исследования у разных групп челюстноротых, роль *Нох*-генов в развитии заднего мозга и КНГ, по-видимому, является высококонсервативной и может быть прослежена по меньшей до уровня общего предка группы (Parker et al., 2019a). Столь древнее происхождение подтверждается и консервативностью регуляторных элементов – *Нох*-энхансеров, определяющих пространственную сегментацию экспрессии и *Нох*-чувствительных энхансерных элементов, относящихся к регулируемым ими генам-мишеням (Kim et al., 2000; McEwen et al., 2009; Ravi et al., 2009; Parker et al., 2011, 2014b; Parker, Krumlauf, 2017).

Анализ геномов двух видов миног – морской миноги (*Petromyzon marinus*) и тихоокеанской миноги (*Lethenteron camtschaticum*) показал наличие у них шести *Нох*-кластеров (в полтора раза больше, чем у челюстноротых!), что свидетельствует о

дополнительных дупликациях у миног (рис. 4, Kuraku, Kuratani, 2006; Mehta et al., 2013; Pascual-Anaya et al., 2018; Smith et al., 2018). При этом потеря части *Нох*-генов в кластерах уменьшила количественную разницу между миногами и челюстноротыми – у миног обнаружено 42 *Нох*-гена, а у мышей 39 – разница отнюдь не в полтора раза (рис. 4). В наиболее антериорных ГП1–4, которые и связаны с экспрессией в заднем мозге и КНГ, в силу чего привлекают к себе максимальное внимание исследователей, у миног описано 14 генов, а у мышей – 12 (Parker et al., 2019a). Проведенный недавно анализ генома и транскриптома миксины *Eptatretus burgeri* обнаружил у этого вида 40 *Нох*-генов, предположительно распределенных по 6 кластерам (Pascual-Anaya et al., 2018). Сравнение их с *Нох*-кластерами миног выявило ряд общих черт. Каждый вид имеет одинаковое количество *Нох*-паралогов в ГП1–4, и это указывает, на то, что, вероятно, разделение *Нох*-кластеров бесчелюстных произошло до дивергенции миног и миксин – более 400 миллионов лет назад (Kuraku, Kuratani, 2006).

Хотя шесть *Нох*-кластеров круглоротых не получается однозначно филогенетически соотнести с четырьмя кластерами челюстноротых (Pascual-Anaya et al., 2018), это не свидетельствует одно-

значно об их независимом происхождении. Произшедшее после предковой дупликации быстрое разделение групп с последующей их дивергенцией в том числе и по нуклеотидным/аминокислотным предпочтениям могут существенно ослабить возможность их уверенного филогенетического объединения на основе доступных сегодня алгоритмов (Qiu et al., 2011). В свою очередь, реконструкции, основанные на сопоставлении порядка генов в хромосомах у разных групп позвоночных, соответствуют модели, в которой у общего предка круглоротых и челюстных было четыре *Hox*-кластера (Smith et al., 2018).

Анализ экспрессии *Hox*-генов миног выявил у них много общих черт с *Hox*-генами челюстноротых, прежде всего касающихся экспрессии в ромбомерах заднего мозга и клетках нервного гребня (Parker et al., 2019a). Отличия наблюдались в деталях поздней экспрессии в области заднего мозга, эндостиле и мезодерме первой жаберной дуги. Сопоставление характера экспрессии и кластерной организации *Hox*-генов у миног и челюстноротых позволяет заключить, что предковые функции *Hox*-генов в этих группах во многом сохраняются, но по-разному распределяются между дочерними кластерами. Другими словами, *Hox*-кластеры миног и челюстноротых, имея общее происхождение, прошли на своем эволюционном пути разные варианты субфункционализации.

У беспозвоночных хордовых — ланцетников и оболочников — также наблюдается коллинеарность единственных *Hox*-кластеров вдоль передне-задней нейральной оси, хотя, у этих групп не обнаруживается характерной для позвоночных сегментации ромбомеров и клеток нервного гребня (Parker, 2019b).

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ — ОДНА ХОРОШО, А ДВЕ ЛУЧШЕ

Основные предполагаемые сценарии полногеномных дупликаций у позвоночных во многом опираются на присутствие одного кластера *Hox*-генов у их ближайших родственников — ланцетников и оболочников, и разное количество кластеров в двух рано разделившихся ветвях позвоночных — бесчелюстных (шесть *Hox*-кластеров) и челюстных (четыре *Hox*-кластера). Исходя из такого количества *Hox*-кластеров понятно, что в истории позвоночных имели место как минимум два раунда дупликаций, а у бесчелюстных, судя по всему, и больше. Исследователи, как правило, сходятся во мнении, что один раунд произошел на уровне общего предка позвоночных (Holland, Osampo Daza, 2018). А вот по поводу второго раунда (и возможных дополнительных) — ведутся дискуссии.

Первой была выдвинута гипотеза о двух раундах у общего предка позвоночных до разделения линий бесчелюстных и челюстноротых (Mehta et al., 2013), а основанием для последующих пересмотров и дискуссий во многом стал проведенный подробный анализ секвенирования полного генома морской миноги.

Получение полноценного сиквенса генома миноги оказалось непростой задачей. Дело в том, что одной из особенностей миног, наряду со способностью функциональной регенерации спинного мозга даже во взрослом состоянии, эволюционно независимого развития адаптивного иммунитета и ряда других, является физическая плановая перестройка генома на ранних стадиях развития (PGR от Programmed Genome Rearrangement). Эта геномная перестройка состоит в редукции примерно 20% генома (около 0.5 млрд оснований из 2.3 млрд оснований всего генома) (Smith et al., 2018). Начинается она на седьмом клеточном делении и длится около трех суток, после чего только геномы клеток зародышевой линии несут полный геном, а соматические клетки — редуцированный. Очевидно, что полный геномный сиквенс в таком случае можно получить только путем анализа геномов клеток зародышевой линии, что было сделано в 2018 г. (Smith et al., 2018). Проведение предварительного картирования распределения контигов по супер-скэффолдам (super-scaffolds — собранные после секвенирования геномные протяженные фрагменты, содержащие в среднем около 10–20 млн оснований, которые в дальнейшем предполагается объединять в хромосомы) позволило сопоставить расположение генов у миног и некоторых челюстноротых. Благодаря развитию алгоритмов обработки больших массивов данных, в основе этого сопоставления лежало уже выявление не отдельных генов-ортологов, а целых групп ортологии между разными геномами.

Сопоставление генома морской миноги с геномами курицы и панцирной щуки (представитель костных ганоидов, у которых, в отличие от более эволюционно продвинутых костистых рыб, не было дополнительной дупликации) позволил выдвинуть гипотезу об одном раунде ПГД у общего предка позвоночных, с предшествующими им локальными дупликациями отдельных участков и последующими дополнительными дупликациями хромосом у бесчелюстных (рис. 5, Smith et al., 2015, 2018). Это предположение основано на том, что больше половины (6 из 11) миножьих ортологических групп соответствуют двум куриным хромосомам. Еще две группы не находят четкой гомологии с четырьмя хромосомами. Что, казалось бы, свидетельствует в пользу двух общих раундов у птиц и миног, причем, эти хромосомы несут как раз хорошо охарактеризованные гены — одна *Hox*

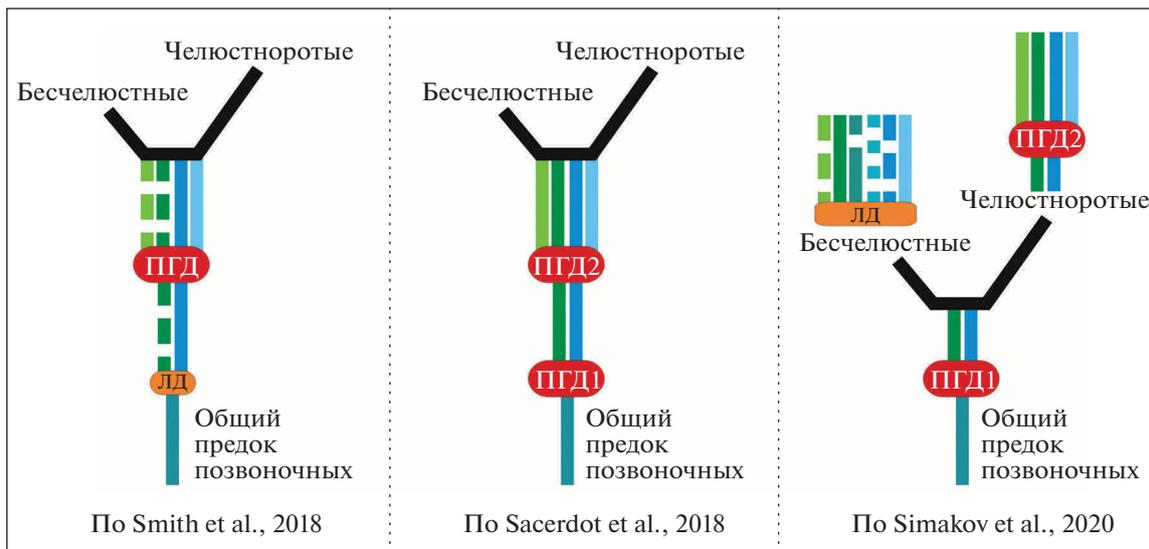


Рис. 5. Схемы рассмотренных моделей геномных дупликаций на ранних этапах развития позвоночных. ПГД – полно-геномные дупликации, ЛД – локальные дупликации.

и *MHC*, вторая – *ParaHox* и *NPYR*, третья – *RAR* и *ALDH1*. Однако Смит и коллеги предполагают, что такая картина могла возникнуть в результате трех независимых хромосомных дупликаций, предшествовавших ПГД. Таким образом, согласно предлагаемой модели, до разделения бесчелюстных и челюстноротых у их общего предка сначала произошли отдельные дупликации трех хромосом, а затем одна полногеномная дупликация (рис. 5, Smith et al., 2018). Хотя, авторы полностью не исключают вероятности того, что нынешний кариотип миног и челюстноротых мог сформироваться в результате двух раундов полногеномной дупликации с последующей элиминацией значительного числа хромосом, они оценивают такой сценарий как менее вероятный.

Авторы полагают, что у миног есть определенные биологические особенности, которые могут способствовать фиксации хромосомных дупликаций в этой группе. Кариотип миног (основным объектом Смита и коллег является морская минога *Petromyzon marinus*) состоит примерно из 100 хромосом, среди которых много, так называемых, малых хромосом, дупликация которых будет затрагивать меньшее число генов, и с большей вероятностью пройдет успешно для организма, чем аналогичная дупликация крупных хромосом у человека. Проведенное в 2020 г. секвенирование генома “дальневосточной ручьевой” миноги *Lethenteron reissneri* выявило у этого вида 72 хромосомы (Zhu et al., 2020). С другой стороны, миноги могут быть очень плодовиты (продуктивность самки морской миноги может достигать 300000 икринок), в силу чего носитель одной мутации может распространить ее на большое число потомков в популяции (Smith et al., 2015, 2018). Причем, есть

основания полагать, что эти характеристики были присущи миногам на протяжении сотен миллионов лет их эволюционной истории, в силу чего они представляют собой очень релевантную модель исследования особенностей предковых форм позвоночных, вполне вероятно обладавших высокой плодовитостью и большим числом малых хромосом (Smith et al., 2018).

Первые попытки реконструкции предкового кариотипа были проведены Накатани и коллегами в 2007 г., когда исследователи выделили в геноме человека консервативные для позвоночных группы связанные генов (Nakatani et al., 2007). Сравнение этих групп с группами других позвоночных (рыб) и оболочников позволило выделить онологи и предположить наличие у предковых позвоночных от 10 до 13 хромосом. По мере накопления данных секвенирования представителем разных групп позвоночных возросли возможности их широкоформатного сравнения и более тонких реконструкций. В 2018 г. Сасердот с коллегами при помощи разработанного ими алгоритма AGORA (Algorithm for Gene order Reconstruction in Ancestors) на основе анализа 61 генома современных позвоночных провели реконструкцию предкового генома амниот – организмов с ориентировочным возрастом 326 млн лет. Выборка включала 40 видов млекопитающих, 3 вида птиц, 2 рептилии, 1 амфибию, 8 костистых рыб, кистеперую рыбу, 2 представителей оболочников, нематоду и дрозофилу (Sacerdot et al., 2018). В результате в предковом геноме амниот предположительно наличие 19786 генов. Были определены предполагаемые пары онологов и выявлены 51 протяженная предковая область (CAR – Contiguous Ancestral Regions) – фрагменты генома, содержащие более

50 генов каждый и по размеру соответствующие хромосомам. Полученные фрагменты группируются в 17 тетрад (17 групп по 4 CAR), что наиболее вероятно соответствует двум раундам полногеномных дупликаций. Причем, выявленные авторами 17 тетрад соответствуют 17 предковым связкам (CLG – Chordate Linkage Group) выявленным ранее при сравнении синтении генов в хромосомах человека и скэффолдах генома ланцетника (Putnam et al., 2008). Количественное отклонение от точного ожидаемого числа хромосом, кратного четырем может быть объяснено исчезновением отдельных хромосом или объединением двух хромосом в одну. Эти явления можно было бы проследить путем анализа геномов внешних групп, но в случае позвоночных геномы ланцетников и оболочников для этих целей, к сожалению, не подходят, поскольку оболочники существенно дивергировали от своего предкового состояния, а у ланцетников геном слишком фрагментирован. Оба этих обстоятельства затрудняют установление хромосомной гомологии. В рамках своей модели Сасердот и коллеги предполагают наличие у предковых позвоночных 17 хромосом, которые при первом раунде дупликации дали начало 34 хромосомам. В дальнейшем произошло 7 объединений хромосом и общее их число редуцировалось до 27, которые во втором раунде, произошедшем до разделения линий бесчелюстных и челюстноротых удвоились с образованием 54 хромосом, часть из которых впоследствии также объединялись. Не исключая теоретические вероятности и других сценариев, полемизируя со Смитом и коллегами, авторы полагают, что сравнение генома миног с реконструированным геномом предка амниот дает более корректные результаты, чем сопоставление с отдельными представителями челюстноротых. В рамках предложенного Сасердот и коллегами анализа группы ортологов в супер-скэффолдах миног в большинстве случаев соответствуют четырем хромосомам у предка амниот (в отличие от модели Смита и коллег, в которой доминировало соотношение 1 : 2), что поддерживает гипотезу о двух общих раундах полногеномной дупликации до разделения бесчелюстных и челюстноротых (рис. 5).

Еще одна модель геномной дупликации у позвоночных была предложена Симаковым и коллегами в 2020 г. В ней, с учетом обновленных данных, авторы рассматривают ланцетника как наиболее близкую к предковым позвоночным группу. Построение модели опирается на те же 17 выявленных консервативных от ланцетника до человека связок (CLG). Авторы предлагают рассматривать синтению групп генов без учета порядка генов в них, который, по их мнению, мог сравнительно легко меняться в ходе эволюции (Simakov et al., 2020). Кариотип ланцетника состоит из 19 хромосом, которые, как предполагает-

ся, произошли от 17 предковых CLG, претерпев некоторые локальные преобразования. Часть хромосом позвоночных, в свою очередь, также произошли от одного CLG, а некоторые – в результате слияния двух или трех CLG с последующими изменениями. Малые хромосомы миног, панцирной щуки и курицы размером менее 15 млн пар оснований считаются потомками одной из CLG (Simakov et al., 2020). Согласно предложенной модели, 10 из 17 CLG представлены в виде тетрад у челюстноротых, а остальные – в виде триплетов. Это свидетельствует в пользу двух раундов дупликаций с последующей утратой части хромосом. Анализ слияния хромосом челюстноротых показывает, что большинство этих событий произошло между первым и вторым раундами дупликаций. В то же время, у круглоротых последствий этих слияний не наблюдается и хромосомы миног, судя по всему, напрямую произошли от одиночных CLG. На основе этих данных авторы выдвигают гипотезу об одном раунде ПГД до разделения бесчелюстных и челюстноротых, с последующим вторым раундом в линии челюстноротых (рис. 5, Simakov et al., 2020).

В отличие от более ранних моделей, в которых оба раунда ПГД предполагали автотетраплоидизацию (удвоение диплоидного генома одного организма) (Furlong, Holland, 2002) или, напротив, аллотетраплоидизацию (слияние двух диплоидных геномов разных организмов) (Spring, 1997), в Симаков и коллеги предполагают, что первый раунд был автотетраплоидизацией, а второй – аллотетраплоидизацией. У миног, после отделения от общего ствола позвоночных, в модели предполагаются дополнительные независимые дупликации.

А ЧТО НА ЭТО СКАЖУТ ГЕНЫ?

Описанные модели, разработанные в последние годы, опираются на широкоформатный анализ данных высокопроизводительного секвенирования, объем которых существенно растет в последнее время. Преимуществом такого подхода, безусловно, является масштаб взгляда на проблему в силу количества анализируемой информации. В то же время, для выявления функциональных основ появления и развития отдельных структур в эволюции и онтогенезе позвоночных, ведутся исследования отдельных семейств регуляторных генов и видится важным сопоставление получаемых лабораторных данных с выдвигаемыми гипотезами. В рамках уточнения количества и времени полногеномных дупликаций в ранней эволюции позвоночных интересен обзор данных по сравнительному анализу ортологов регуляторных генов в линиях бесчелюстных и челюстноротых. Благодаря секвенированию генома морской миноги, в последние годы повышается и уровень лабора-

торных исследований отдельных семейств генов у этой группы. Рассмотрим поподробней некоторые примеры.

При исследовании геноархитектуры конечного мозга миног, в его дорсальной части была обнаружена экспрессия генов *Paxb* (Murakami et al., 2001) и *Emx* (Tank et al., 2009), а в вентральной — генов *Dlx* (Miojin et al., 2001; Murakami et al., 2001; Neidert et al., 2002). Обнаружение зон экспрессии *Paxb* и *Dlx* и стало на ранних этапах исследований основным свидетельством наличия у миног структур, гомологичных конечному мозгу челюстноротых. Впоследствии, у миног были обнаружены три ортолога гена *Paxb*. Все они экспрессируются в формирующихся глазных структурах и мозге, что соответствует экспрессии гена *Paxb* у челюстноротых, у которых этот ген является ключевым регулятором развития глаз и ЦНС (Osumi et al., 2008; Klimova, Kozmik, 2014). При этом паттерн экспрессии генов *Paxb* миног в других структурах различается, что может служить примером пространственной субфункционализации. Экспрессия *Paxb α* обнаруживается в печени, указывая на то, что у предков позвоночных ген *Paxb*, по всей видимости, участвовал в формировании этого органа (Ravi et al., 2019). Анализ синтении (набора соседних генов) показал, что *Paxb α* имеет общие соседние гены (*Eif3m* и *Calu α* на 5' конце и *Elp4* на 3' конце) с геном *Paxb.1* челюстноротых и геном *PAXB* человека, что указывает на их ортологию. Лocus миножего *Paxb β* содержит гены *Calu β* и *Fbxo47*, которые также обнаруживаются в окружении гена *Paxb.2* у некоторых представителей челюстноротых. Третий ген *Paxb* миног, *Paxb γ* , не обнаруживает синтении с *Pax* генами челюстноротых. Обнаружение у миног трех ортологов гена *Paxb*, очевидно, указывает как минимум на два раунда дупликаций, приведших к их появлению. Поскольку только два из них имеют синтению с генами *Paxb* челюстноротых, авторы заключают, что их данные вполне могут соответствовать гипотезе Смита и коллег об одном общем раунде полногеномной дупликации для бесчелюстных и челюстноротых, а третий ортолог *Paxb* появился у миног в результате локальной дупликации (Ravi et al., 2019). В то же время, как уже упоминалось выше, исследования геномного расположения и особенностей экспрессии показали, что гены *Pax4* и *Paxb* челюстноротых являются ортологами, произошедшими в результате ПГД и последующей асимметричной дивергенции (Manousaki et al., 2011). Показано, что их экспрессия наблюдается в печени, сетчатке и шишковидной железе, что указывает на общность происхождения регуляторных элементов. Есть и отличия, в частности, *Pax4* не экспрессируется в центральной нервной системе, включая глаза и обонятельные плакоды. Анализ аминокислотных последовательностей показал, что *Pax4* претерпел более глубокие

изменения своей структуры, что и позволяет говорить об асимметричной дивергенции ортологов (Manousaki et al., 2011; Holland et al., 2016). В сочетании с данными по генам *Paxb* у миног (ортологи *Pax4* у них пока не описаны), на наш взгляд, в этом случае можно говорить о двух раундах дупликаций в истории *Pax* генов — в результате первого произошло разделение линий *Pax4* и *Paxb*, а в результате второго — *Paxb α* и *Paxb β* . Такой сценарий вполне соответствует модели двух раундов ПГД до разделения бесчелюстных и челюстноротых.

Еще одним примером выступает описание и исследование у миног и челюстноротых генов семейства *Noggin*, которые являются важными регуляторами раннего развития структур переднего мозга позвоночных. *Noggin* стал первым известным фактором, в норме секретирующимся в области Шпеманновского организатора, для которого была показана способность вызывать формирование дополнительных осей тела в случаях его экспериментальной эктопической экспрессии на вентральной стороне зародыша амфибий (Dale, Slack, 1987; Smith, Harland, 1992; Lamb et al., 1993; Smith et al., 1993; Slack, Tannahill, 1993). Впоследствии были описаны два гомолога гена *Noggin* — *Noggin2* и *Noggin4* (Fletcher et al., 2004; Eroshkin et al., 2006). Долгое время считалось, что основной (по сути — единственной описанной) функцией *Noggin1* в развитии позвоночных является подавление сигнального каскада BMP (bone morphogenetic proteins) — группы ростовых факторов из суперсемейства TGF-beta. Модуляция активности BMP каскада является необходимым условием для формирования нервной ткани и дифференцировки дорсальной мезодермы (Xanthos et al., 2002; Moreau, Leclerc, 2004). При исследовании гена *Noggin2* было показано, что он обладает способностью подавлять не только BMP, но также и Nodal/Activin и Wnt/beta-catenin сигнальные каскады, играющих ключевые роли в клеточной дифференцировке и развитии головных структур позвоночных. Оверэкспрессия мРНК *Noggin2* в зародышах *X. laevis* приводит к формированию дополнительного комплекса осевых структур, в которых наблюдается экспрессия переднеголовных генов (Bayramov et al., 2011). У челюстных, за исключением костистых рыб, было описано 3 гена семейства *Noggin* — *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4*. У миног были обнаружены 4 гена (*NogginA*, *NogginB*, *NogginC* и *NogginD*) (Ermakova et al., 2020, 2021). Гены *NogginA*, *NogginB*, *NogginC* продемонстрировали сходство аминокислотных последовательностей и синтению с генами *Noggin1*, *Noggin2* челюстноротых, а ген *NogginD* — с геном *Noggin4*. Оказалось, что гены *NogginB* и *Noggin2* имеют сходный специфический паттерн экспрессии в области конечного мозга (рис. 6а). Ген *Noggin2* позвоночных уже был описан ранее в качестве

важного регулятора формирования переднеголовных структур у амфибий (Baigamov et al., 2011). Экспрессия *NogginA* в нервной системе и мезодермальных структурах, в свою очередь, похожа на экспрессию *Noggin1*, а экспрессия *NogginC* имеет общие черты как с экспрессией *Noggin1*, так и *Noggin2*. Диффузный характер экспрессии *NogginD* сходен с экспрессией *Noggin4* челюстноротых. Функциональный анализ способности генов *Noggin* миног индуцировать формирование дополнительного комплекса осевых структур подтвердил эти гомологии (рис. 6б). В совокупности, если исключить возможность независимого появления столь сходных характеристик генов семейства *Noggin* у бесчелюстных и челюстноротых, можно заключить, что к моменту разделения их линий у их общего предка уже присутствовали как минимум три разных гена *Noggin*. Поскольку у ближайших родственников позвоночных, ланцетников и ацидий, описано по одному гену *Noggin*, появление трех копий предполагает, как минимум, два раунда дупликаций. В связи с этим, исходя из совокупного анализа структуры, экспрессии и функциональных свойств генов *Noggin* можно говорить о двух раундах дупликаций предкового генома, произошедших в период между появлением общего предка позвоночных и дивергенцией линий бесчелюстных и челюстноротых. Приходится признать, что на данном этапе у нас нет возможности уверенно установить были эти дупликации полногеномными или дупликациями крупных фрагментов генома. В этом случае эволюционная история генов *Noggin* может описываться как моделью Смита и коллег, так и модель Сасердот и коллег (рис. 6в).

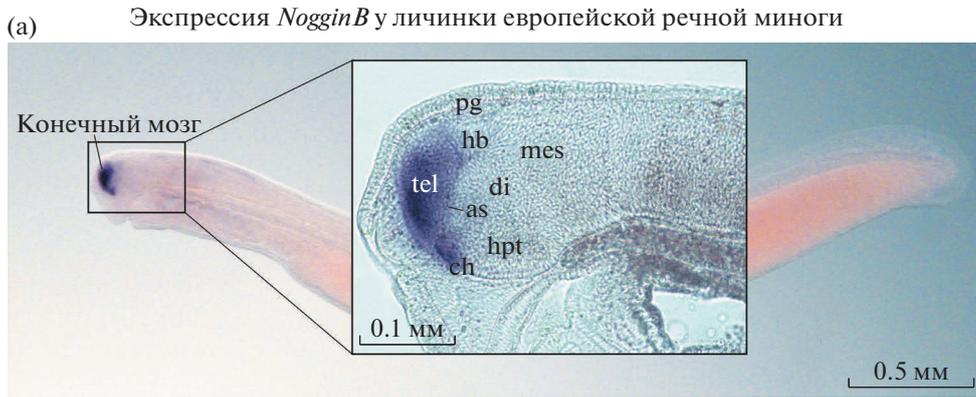
Модель Симакова и коллег, предполагающая один общий раунд дупликации у предковых позвоночных, может описать появление имеющихся *Noggin* генов при принятии одного из допущений: 1) исходно у позвоночных было два предковых гена *Noggin* (в этом случае, очевидно, *NogginA/B/C/1/2* и *NogginD/4*) или 2) независимой дивергенции *NogginA/B/C* и *Noggin1/2* у миног и челюстноротых. Контраргументы в первом случае — один *Noggin* ген у ланцетников и оболочников, а во втором — попарное сходство паттернов экспрессии *NogginA* и *Noggin1* с одной стороны и *NogginB* и *Noggin2* с другой. Безусловно, полностью исключить вероятность реализации таких сценариев невозможно, но они кажутся менее вероятными и требующими больших допущений, чем упомянутые выше два раунда предковой дупликации (Ermaikova et al., 2020).

Похожую картину продемонстрировало исследование генов семейства *CRD* (corticotropin-releasing hormone) (Cardoso et al., 2020). Ранее у челюстноротых было описано пять генов этого семейства (*CRH1/CRH2/UCN1* и *UCN2/UCN3*), произошедших от двух предковых генов в результате двух раундов дупликаций с последующими

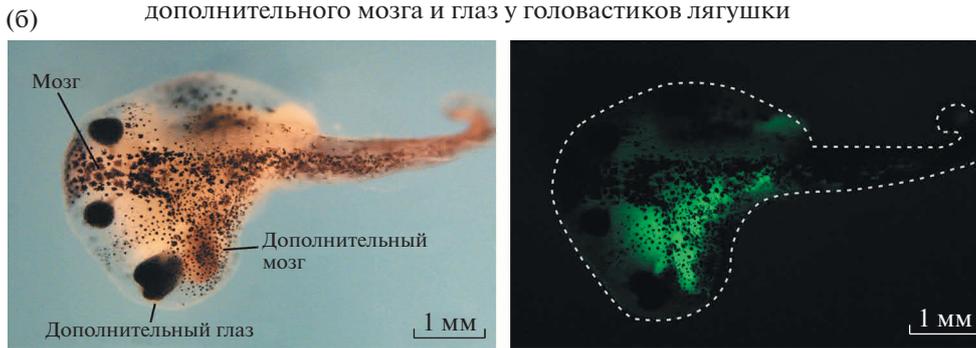
частичными редукциями (Cardoso et al., 2016). У миног также были обнаружены пять генов этого семейства, которые при филогенетическом анализе последовательностей не продемонстрировали прямой 1 : 1 ортологии с генами челюстноротых. При построении филогенетических деревьев три миножьих гена группируются с генами *CRH1/CRH2/UCN1*, а два других — с генами *UCN2/CN3* челюстноротых (полагаем, как и в случае генов *Noggin*, это можно назвать “облачной ортологией”). Это позволяет предположить происхождение *CRH* генов миног от тех же двух предковых генов, что и *CRH* генов челюстноротых, а отсутствие прямой ортологии объяснить упоминавшимся выше “миножьим диалектом”. Проведенный анализ окружающих генов показал, что некоторые из них представлены у миног четырьмя копиями (тетрадами). Наиболее простым объяснением такого распределения *CRH* генов у миног является предположение о том, что в своей эволюции они прошли те же два раунда дупликаций, что и гены челюстноротых, что соответствует двухраундовым моделям дупликации у предка позвоночных (Cardoso et al., 2020).

Гены, входящие в подсемейство *FoxP*, играют важную роль в развитии и поддержании многих структур и функциональных систем организма — легких, сердца, ЦНС, иммунной системы (Song et al., 2016). Белки FoxP содержат в своей структуре три важных домена — цинковый палец, лейциновую молнию и ДНК-связывающий forkhead-домен, характерный для всех Fox белков (Takahashi et al., 2009). У ланцетников и оболочников описано по одному гену *FoxP*, в то время как у большинства позвоночных — четыре (*FoxP1–4*) (Takahashi et al., 2009; Santos et al., 2011), хотя есть и исключения. Так, у птиц отсутствует *FoxP3*, а у костистых рыб, вследствие дополнительного раунда полногеномной дупликации, напротив, количество генов семейства увеличено (Yang et al., 2010; Andersen et al., 2012; Song et al., 2013). У млекопитающих *FoxP* гены располагаются в паралогичных хромосомах, что свидетельствует об их происхождении в результате крупномасштабных дупликаций (Dehal, Boore, 2005). Вполне органичной в таком контексте выглядит гипотеза о двух раундах полногеномной дупликации. Подтверждением этой гипотезы стало описание четырех *FoxP* генов у миног (Song et al., 2016). Причем, аналогичная картина была описана и для других генов, связанных с *FoxP* как расположенным в хромосомах, так, судя по всему, и функционально — генами семейств *MIT*, *mGluR* и *PLXNA* (Song et al., 2016).

Гены *ParaHox* представляют собой кластер древних регуляторных гомеобоксных генов, эволюционно родственных с *Hox*-генами (Zhang et al., 2017). Кластер *ParaHox* включает три семейства транскрипционных факторов — *Gsx* (у человека —



Микроинъекция мРНК *NogginB* миноги вызывает развитие дополнительного мозга и глаз у головастика лягушки



(в) Появление новых генов семейства *Noggin* у позвоночных

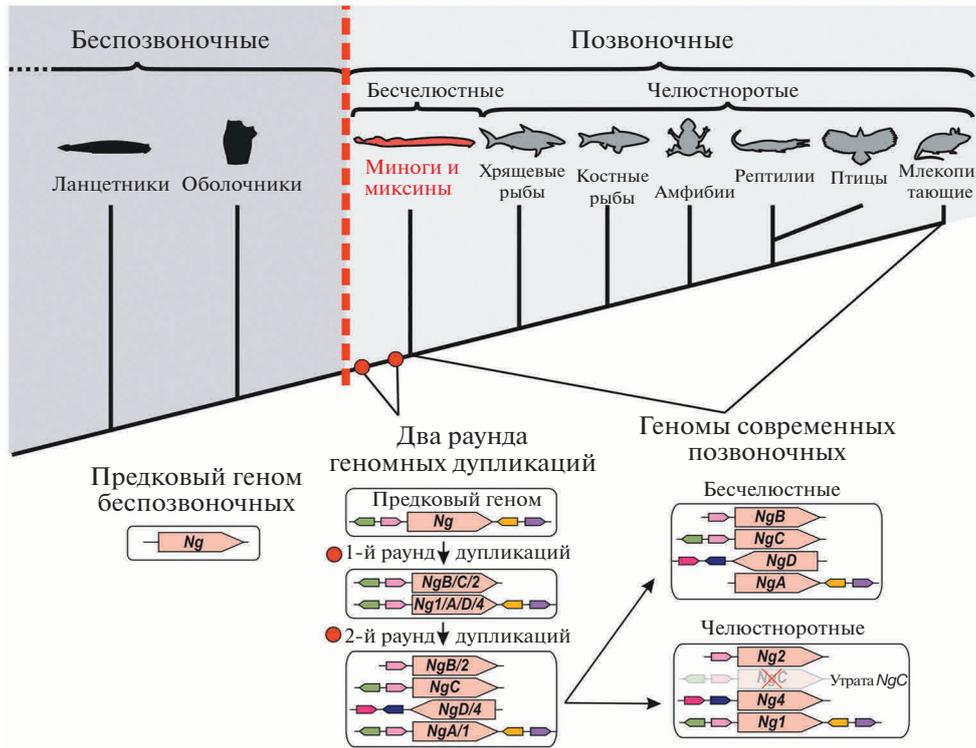


Рис. 6. а, б – ген *NogginB* речной миноги *Lampetra fluviatilis* экспрессируется в зачатке переднего мозга и может индуцировать формирование дополнительного комплекса осевых структур у зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (консерватизм экспрессии и функциональных свойств). as – anterior intra-encephalic sulcus; ch – optic chiasma; di – diencephalon; hb – habenula; hpt – hypothalamus; mes – mesencephalon; pg – pineal gland; tel – telencephalon. в – предполагаемая схема появления генов семейства *Noggin* в эволюции позвоночных (по Ermakova et al., 2020).

GSH), *Pdx* (синонимы *Xlox*, *Ipf1*), и *Cdx*, участвующих в развитии нервной и пищеварительной систем (Valerius et al., 1995). У ланцетника описан один *ParaHox* кластер, включающий все три гена. У позвоночных *ParaHox* гены распределены по четырем и более локусам, каждый из которых далеко не всегда содержит полный набор из генов. К примеру, у человека кластер в 13-ой хромосоме содержит все три гена (*GSH1*, *PDX1*, *CDX2*), а остальные три локуса — лишь по одному гену — *GSH2* в 4-ой хромосоме, *CDX1* в 5-ой хромосоме и *CDX4* в X хромосоме. Анализ дупликаций генов, окружающих *ParaHox* кластеры в четырех хромосомах человека, свидетельствует о появлении этих кластеров в результате двух раундов ПГД (Polard, Holland, 2000). Для уточнения ранних этапов эволюции *ParaHox* генов, внимание исследователей традиционно обратилось к круглоротым, как эволюционно древней группе. Анализ геномных и транскриптомных сиквенсов показал наличие у миног пяти *ParaHox* генов, организованных в два кластера *Gsx α -Pdx α -Cdx α* и *Gsx β -Cdx β* . Филогенетический анализ, как это часто случается при анализе генов миног, оказался не очень информативным для поиска прямой ортологии с генами челюстноротых, поскольку гены миног, в силу особенностей состава (уже неоднократно упоминавшийся ранее “миножий диалект”) уверенней кластеризуются друг с другом, чем с ортологами в других группах. Подобный эффект неоднократно наблюдался и при анализах других семейств генов — *Hox*, *KCNA*, *p53* (Qiu et al., 2011; Mehta et al., 2013; Coffill et al., 2016). Поскольку у миног описано 6 кластеров *Hox*-генов, вероятно, дупликации, приведшие к их появлению, не затронули *ParaHox* гены, свидетельствуя о локальности этих дупликаций. Альтернативным сценарием для *ParaHox* генов является общая с *Hox*'ами дупликация с последующей утратой дублицировавшихся кластеров и редукцией их количества до двух (Zhang et al., 2017). В поддержку такого сценария выступает обнаружение у тихоокеанской миноги (*L. camtshchaticum*) гомологов генов, соседствующих с *ParaHox* кластерами у челюстноротых. Гены *Pdgfra* и *Kit* связаны с *ParaHox* В-кластером, а *Pdgfrb* и *Csf1r* — с С-кластером. И если ген *Kit* у миног связан с b-кластером *ParaHox* генов, то *Csf1r* расположен отдельно, в участке генома, не несущем *ParaHox* гены. Два гена *Pdgfr* миног также не соседствуют с *ParaHox* кластерами. Присутствие в геноме миног четырех генов-соседей может свидетельствовать о том, что в прошлом *ParaHox* кластеров также было больше, но часть из них была утрачена (Zhang et al., 2017). Это допущение позволяет соотнести имеющиеся у современных миног два кластера *ParaHox* генов с гипотезой о двух раундах полногеномных дупликаций у предков позвоночных.

ДУПЛИКАЦИИ У РЫБ – ОТ ЧАСТНОГО К ОБЩЕМУ

Кроме описанных выше ПГД на ранних этапах эволюции позвоночных, внесших вклад в формирование генома всех представителей этого подтипа, свидетельства более поздних дупликаций были обнаружены и в отдельных эволюционных линиях позвоночных. Очевидно, что исследование особенностей и значения таких дупликаций по сравнительно “горячим следам”, может дать уникальную информацию о базовых механизмах и вкладе полногеномных дупликаций в эволюционную историю живых организмов в целом.

Наиболее описанными такими событиями на сегодняшний день являются дупликации у осетровых рыб, дупликации у предка костистых рыб, а также дополнительные раунды дупликаций у отдельных представителей этого класса — лососевых и карповых рыб (Brunet et al., 2006; Glasauer, Neuhauss, 2014; Du et al., 2020).

Осетровые рыбы, хрящевые ганоиды, отделились от общего эволюционного ствола позвоночных около 345 млн лет назад, вскоре после расхождения линий лучеперых и двоякодышащих рыб. Осетровых отличает низкая скорость эволюционных изменений, а раннее развитие икры внешне больше похоже на развитие икры амфибий, чем рыб, что свидетельствует об их архаичности. Особенностью кариотипа осетровых является наблюдаемая у них полиплоидия, с числом хромосом от 120 до 360–380 у разных видов (Havelka et al., 2013). Такая склонность к полиплоидизации может объясняться, хотя бы отчасти, тем, что анализ генома не выявил у представителей осетровых (стерляди) выраженных половых хромосом, наличие которых, как указывалось ранее, может служить ограничителем дупликационных изменений (Du et al., 2020). Исследователи склоняются к тому, что полиплоидия осетров носит автоплоидный характер. При этом, неожиданным оказался очень высокий процент сохранения генов после дупликаций — в среднем около 70%, а для отдельных групп генов, таких как гены глутаматных рецепторов — до 88.5%. Восемь кластеров *Hox*-генов у стерляди насчитывают 88 генов. При этом отмечается, что, в отличие от костистых рыб, утрата генов у осетров как правило происходит вследствие утраты крупных участков генома — плеча хромосомы или даже хромосомы целиком без заметных перестроек в геноме, вследствие чего хромосомы осетров в основном имеют дискретно диплоидный или тетраплоидный статус.

Первые гипотезы о дополнительной дупликации у костистых рыб были выдвинуты для объяснения обнаружения у представителей этой группы двух ортологов многих генов наземных позвоночных, хотя масштабы этой дупликации не были очевидны изначально (Wittbrodt et al., 1998; Taylor

et al., 2001). У рыбы *Danio rerio*, а впоследствии и у эволюционно наиболее ранних представителей групп *Elopomorpha* и *Osteoglossomorpha*, были описаны 7 кластеров *Hox*-генов (Amores et al., 1998; Prince et al., 1998; Chambers et al., 2009; Guo et al., 2009; Henkel et al., 2012). Открытие двойного набора *Hox*-генов у ранних представителей костистых рыб стало свидетельством дубликации у предка группы, подтвержденного впоследствии результатами полногеномного секвенирования многих ее представителей (Glasauer, Neuhaus, 2014).

Дополнительные дубликации геномов происходили позже и у отдельных представителей костистых рыб. На сегодняшний день описаны дубликации у предков лососевых и карповых рыб (Alexandrou et al., 2013; Zhang et al., 2013) и, не исключено, что это число будет расти.

Однозначно судить о вкладе полногеномной дубликации в развитие костистых рыб сложно, но можно отметить, что эта группа, представители которой освоили самые разнообразные места обитания и экологические ниши, на сегодняшний день включает в себя примерно половину всех описанных видов позвоночных (около 32000 из 64000–68000) (Glasauer, Neuhaus, 2014; Ravi et al., 2018). Такая статистика, вкуче с общим разнообразием позвоночных позволяет отметить корреляцию предковых геномных дубликаций с последующим морфологическим разнообразием и эволюционными успехами группы, хотя механизмы влияния дубликаций на эти процессы еще только предстоит изучить (Ravi et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подытоживая рассмотренные в обзоре модели и примеры, можно отметить, что, несмотря на все ограничения и сложности однозначного решения вопроса о количестве и времени раундов полногеномных дубликаций на ранних этапах эволюции позвоночных, и неизбежных допущениях принимаемых в каждом из рассматриваемых сценариев, “классическая” модель, предполагающая два раунда полногеномных дубликаций у общего предка всей группы не теряет своей актуальности и выглядит убедительно во многих случаях.

Беспрецедентные прорывы последних лет в повышении доступности методов высокопроизводительного секвенирования и обработки больших объемов получаемой информации, в сочетании с возрастающим интересом исследователей к не вполне традиционным, но крайне важным с филогенетической точки зрения модельным объектам, позволяют уже в ближайшей перспективе рассчитывать на существенное сокращение числа “белых пятен” в нашем понимании фундаментальных основ эволюционной истории позвоночных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено, и публикация подготовлена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50172.

Представленное в статье исследование экспрессии генов *Noggin* миног выполнено за счет гранта РФФИ № 18-04-00015, функциональный анализ генов *Noggin* миног выполнен за счет гранта РФФИ № 18-29-07014 МК, филогенетический анализ и модель эволюции генов *Noggin* миног (рис. 6в) выполнены за счет гранта № 20-04-00675А.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adachi N., Robinson M., Goolsbee A. et al.* Regulatory evolution of *Tbx5* and the origin of paired appendages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113(36). P. 10115–10120.
- Albertin C.B., Simakov O., Mitros T. et al.* The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties // *Nature*. 2015. V. 524. P. 220–224.
- Alexandrou M.A., Swartz B.A., Matzke N.J. et al.* Genome duplication and multiple evolutionary origins of complex migratory behavior in Salmonidae // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013. V. 69. P. 514–523.
- Amores A., Force A., Yan Y.L. et al.* Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution // *Science*. 1998. 282:1711–1714.
- Andersen K.G., Nissen J.K., Betz A.G.* Comparative genomics reveals key gain-of-function events in *Foxp3* during regulatory T cell evolution // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 113.
- Bassham S., Canestro C., Postlethwait J.H.* Evolution of developmental roles of *Pax2/5/8* paralogs after independent duplication in urochordate and vertebrate lineages // *BMC Biol.* 2008. V. 6(1). P. 35.
- Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y. et al.* Novel functions of *Noggin* proteins: inhibition of *Activin/Nodal* and *Wnt* signaling // *Development*. 2011. V. 138. P. 5345–5356.
- Blomme T., Vandepoele K., de Bodt S. et al.* The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution // *Genome Biol.* 2006. V. 7. P. R43.
- Braasch I., Salzburger W., Meyer A.* Asymmetric evolution in two fish-specifically duplicated receptor tyrosine kinase paralogs involved in teleost coloration // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. P. 1192–1202.

- Braasch I., Gehrke A.R., Smith J.J. et al.* The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons // *Nature Genet.* 2015. V. 47. P. 427–437.
- Brazeau M.D., Friedman M.* The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates // *Nature.* 2015. V. 520. P. 490–497.
- Brunet F.G., Roest Crolius H., Paris M. et al.* Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. P. 1808–1816.
- Campanini E.B., Vandewege M.W., Pillai N.E. et al.* Early evolution of vertebrate Mybs: an integrative perspective combining synteny, phylogenetic, and gene expression analyses // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7(11). P. 3009–3021.
- Cardoso J.C.R., Bergqvist C.A., Larhammar D.* Corticotropin-releasing hormone (CRH) gene family duplications in lampreys correlate with two early vertebrate genome doublings // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 672.
- Cardoso J.C.R., Bergqvist C.A., Félix R.C. et al.* Corticotropin-releasing hormone family evolution: five ancestral genes remain in some lineages // *J. Mol. Endocrinol.* 2016. V. 57. P. 73–86.
- Carroll S.B.* Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution // *Cell.* 2008. V. 134(1). P. 25–36.
- Carroll S.B.* Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates // *Nature.* 1995. V. 376. P. 479–485.
- Chambers K.E., McDaniel R., Raincrow J.D. et al.* Hox cluster duplication in the basal teleost *Hiodon alosoides* (Osteoglossomorpha) // *Theory Biosci.* 2009. V. 128. P. 109–120.
- Christensen K.A., Davidson W.S.* Autopolyploidy genome duplication preserves other ancient genome duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *PLoS One.* 2017. V. 12(2). P. e0173053.
- Ciomborowska J., Rosikiewicz W., Szklarczyk D. et al.* ‘Orphan’ retrogenes in the human genome // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 384–396.
- Coates M.* The evolution of paired fins // *Theory Biosci.* 2003. V. 122(2–3). P. 266–287.
- Coffill C.R., Lee A.P., Siau J.W. et al.* The p53-Mdm2 interaction and the E3 ligase activity of Mdm2/Mdm4 are conserved from lampreys to humans // *Genes Dev.* 2016. V. 30(3). P. 281–292.
- Conant G.C., Wolfe K.H.* Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast // *Mol. Syst. Biol.* 2007. V. 3. P. 129.
- Dahn R.D., Davis M.C., Pappano W.N. et al.* Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning // *Nature.* 2007. V. 445. P. 311–314.
- Dale L., Slack J.M.W.* Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis* // *Development.* 1987. V. 100. P. 279–295.
- Davis C.A., Holmyard D.P., Millen K.J. et al.* Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum // *Development.* 1991. V. 111(2). P. 287–298.
- Dehal P., Boore J.L.* Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate // *PLoS Biol.* 2005. V. 3(10). P. e314.
- DesMarais D.L., Rausher M.D.* Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene // *Nature.* 2008. V. 454. P. 762–765.
- Donoghue P.C., Keating J.N.* Early vertebrate evolution // *Palaeontology.* 2014. V. 57. P. 879–893.
- Donoghue P.C.J., Purnell M.A.* Genome duplication, extinction and vertebrate evolution // *Trends Ecol. Evol.* 2005. V. 20. P. 312–319.
- Douard V., Brunet F., Boussau B. et al.* The fate of the duplicated androgen receptor in fishes: a late neofunctionalization event? // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. P. 336.
- Du K., Stöck M., Kneitz S. et al.* The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization // *Nat. Ecol. Evol.* 2020. V. 4(6). P. 841–852.
- Duboule D.* The rise and fall of Hox gene clusters // *Development.* 2007. V. 134. P. 2549–2560.
- Duboule D., Dolle P.* The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 1497–1505.
- Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zarskiy A.G. et al.* Discovery of four Noggin genes in lampreys suggests two rounds of ancient genome duplication // *Communication Biology.* 2020. V. 3(1). P. 532.
- Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zarskiy A.G. et al.* Comparative analysis of expression patterns of genes of the Noggin family at early stages of development of the head structures of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52(1). P. 1–10.
- Eroshkin F.M., Ermakova G.V., Bayramov A.V. et al.* Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis* // *Gene Expr. Patterns.* 2006. V. 6. P. 180–186.
- Faas L., Isaacs H.V.* Overlapping functions of Cdx1, Cdx2, and Cdx4 in the development of the amphibian *Xenopus tropicalis* // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. P. 835–852.
- Fletcher R.B., Watson A.L., Harland R.M.* Expression of *Xenopus tropicalis* noggin1 and noggin2 in early development: two noggin genes in a tetrapod // *Gene Expr. Patterns.* 2004. V. 5. P. 225–230.
- Flot J.-F., Hespeels B., Li X. et al.* Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* // *Nature.* 2013. V. 500. P. 453–457.
- Force A., Lynch M., Pickett F.B. et al.* Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // *Genetics.* 1999. V. 151. P. 1531–1545.
- Forstmeier W., Ellegren H.* Trisomy and triploidy are sources of embryo mortality in the zebra finch // *Proc. Biol. Sci.* 2010. V. 277(1694). P. 2655–2660.
- Freeling M.* The evolutionary position of subfunctionalization, downgraded // *Genome Dyn.* 2008. V. 4. P. 25–40.
- Furlong R.F., Holland P.W.H.* Were vertebrates octoploid? // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2002. V. 357. P. 531–544.
- Futahashi R., Kawahara-Miki R., Kinoshita M. et al.* Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. E1247–E1256.

- Gans C., Northcutt R.G.* Neural crest and the origin of vertebrates: a new head // *Science*. 1983. V. 220. P. 268–274.
- Gee H.* Across the Bridge: Understanding the Origin of the Vertebrates. Chicago: University of Chicago Press, 2018.
- Gilbert S.F.* Developmental Biology. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 9th ed.
- Glaser S.M., Neuhauss S.C.* Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences // *Mol. Genet. Genomics*. 2014. V. 289(6). P. 1045–1060.
- Goode D.K., Elgar G.* The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective // *Dev Dyn*. 2009. V. 238(12). P. 2951–2974.
- Graham A., Papalopulu N., Krumlauf R.* The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression // *Cell*. 1989. V. 57. P. 367–378.
- Green S.A., Bronner M.E.* The lamprey: A jawless vertebrate model system for examining origin of the neural crest and other vertebrate traits // *Differentiation*. 2014. V. 87. P. 44–51.
- Green S.A., Simoes-Costa M., Bronner M.* Evolution of vertebrates as viewed from the crest // *Nature*. 2015. V. 520. P. 474–482.
- Guerreiro I., Nunes A., Woltering J.M. et al.* Role of a polymorphism in a Hox/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110(26). P. 10682–10686.
- Guo B., Gan X., He S.* Hox genes of the Japanese eel *Anguilla japonica* and Hox cluster evolution in teleosts // *J. Exp. Zool.* 2009. V. 15. 314(2). P. 135–147.
- Gutierrez-Mazariegos J., Kumar E., Studer R.A. et al.* Evolutionary diversification of retinoic acid receptor ligand-binding pocket structure by molecular tinkering // *R. Soc. Open Sci*. 2016. V. 3(3). P. 150484.
- Hall B.K.* The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution // N.Y.: Springer, 2008.
- Havelka M., Hulák M., Bailie D. et al.* Extensive genome duplications in sturgeons: new evidence from microsatellite data // *J. Appl. Ichthyol.* 2013. V. 29. P. 704–708.
- Heimberg A.M., Cowper-Sal-Lari R., Sémon M. et al.* microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 19379–19383.
- Henkel C.V., Burgerhout E., de Wijze D.L. et al.* Primitive duplicate hox clusters in the European eel's genome // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e32231.
- Holland L.Z., Ocampo Daza D.* A new look at an old question: when did the second whole genome duplication occur in vertebrate evolution? // *Genome Biol*. 2018. V. 19(1). P. 209.
- Holland L.Z.* Evolution of new characters after whole genome duplications: insights from amphioxus // *Semin. Cell. Dev. Biol*. 2013. V. 24(2). P. 101–109.
- Holland P.* Gene duplication: past, present and future // *Semin. Cell. Biol*. 1999. V. 10. P. 541–547.
- Hufton A.L., Mathia S., Braun H. et al.* Deeply conserved chordate noncoding sequences preserve genome synteny but do not drive gene duplicate retention // *Genome Res*. 2009. V. 19. P. 2036–2051.
- Hughes A.L.* The evolution of functionally novel proteins after gene duplication // *Proc. Biol. Sci*. 1994. V. 256. P. 119–124.
- Innan H., Kondrashov F.* The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models // *Nat. Rev. Genet*. 2010. V. 11(2). P. 97–108.
- Jaillon O., Aury J.M., Brunet F. et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype // *Nature*. 2004. V. 431(7011). P. 946–957.
- Janvier P.* Facts and fancies about early fossil chordates and vertebrates // *Nature*. 2015. V. 520(7548). P. 483–489.
- Janvier P.* The dawn of the vertebrates: characters versus common ascent in the rise of current vertebrate phylogenies // *Palaeontology*. 1996. V. 39. P. 259–287.
- Janvier P.* Vertebrate characters and the Cambrian vertebrates // *C.R. Palevol*. 2003. V. 2. P. 523–531.
- Joyner A.L., Martin G.R.* En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the Drosophila engrailed gene: expression during embryogenesis // *Genes Dev*. 1987. V. 1(1). P. 29–38.
- Kassahn K.S., Dang V.T., Wilkins S.J. et al.* Evolution of gene function and regulatory control after wholegenome duplication: comparative analyses in vertebrates // *Genome Res*. 2009. V. 19. P. 1404–1418.
- Kenny N.J., Chan K.W., Nong W. et al.* Ancestral whole-genome duplication in the marine chelicerate horseshoe crabs // *Heredity (Edinb)*. 2016. V. 116(2). P. 190–199.
- Kim C.B., Amemiya C., Bailey W. et al.* Hox cluster genomics in the horn shark, *Heterodontus francisci* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 1655–1660.
- Kimura M., King J.L.* Fixation of a deleterious allele at one of two “duplicate” loci by mutation pressure and random drift // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 2858–2861.
- Klimova L., Kozmik Z.* Stage-dependent requirement of neuroretinal *Pax6* for lens and retina development // *Development*. 2014. V. 141. P. 1292–1302.
- Kmita M., Duboule D.* Organizing axes in time and space; 25 years of collinear tinkering // *Science*. 2003. V. 301. P. 331–333.
- Kondrashov F.A., Koonin E.V.* A common framework for understanding the origin of genetic dominance and evolutionary fates of gene duplication // *Trends Genet*. 2004. V. 20. P. 287–291.
- Kondrashov F.A., Rogozin I.B., Wolf Y.I. et al.* Selection in the evolution of gene duplications // *Genome Biol*. 2002. V. 3. research0008.1–0008.9.
- Kozmik Z., Holland N.D., Kalousova A. et al.* Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region // *Development*. 1999. V. 126. P. 1295–1304.
- Krumlauf R.* Hox genes in vertebrate development // *Cell*. 1994. V. 78. P. 191–201.
- Kuraku S., Meyer A., Kuratani S.* Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? // *Mol. Biol. Evol*. 2009. V. 26(1). P. 47–59.
- Kuraku S., Kuratani S.* Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and

- lamprey cDNA sequences // *Zool. Sci.* 2006. V. 23. P. 1053–1064.
- Kuraku S., Meyer A. The evolution and maintenance of Hox gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication // *Int. J. Dev. Biol.* 2009. V. 53. P. 765–773.
- Kuratani S. Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty // *J. Anat.* 2004. V. 205. P. 335–347.
- Kuratani S., Ota K.G. Hagfish (Cyclostomata, Vertebrata): searching for the ancestral developmental plan of vertebrates // *BioEssays*. 2008. V. 30. P. 167–172.
- Lagman D., Ocampo Daza D., Widmark J. et al. The vertebrate ancestral repertoire of visual opsins, transducin alpha subunits and oxytocin/vasopressin receptors was established by duplication of their shared genomic region in the two rounds of early vertebrate genome duplications // *BMC Evol Biol.* 2013. V. 13(1). P. 238.
- Lamb T.M., Knecht A.K., Smith W.C. et al. Neural induction by secreted polypeptide noggin // *Science*. 1993. V. 262. P. 713–718.
- Li W.H. Rate of gene silencing at duplicate loci: a theoretical study and interpretation of data from tetraploid fishes // *Genetics*. 1980. V. 95. P. 237–258.
- Lowe C.J., Clarke D.N., Medeiros D.M. et al. The deuterostome context of chordate origins // *Nature*. 2015. V. 520. P. 456–465.
- Lynch M., Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. 2000. V. 154. P. 459–473.
- Lynch M., O'Hely M., Walsh B. et al. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate // *Genetics*. 2001. V. 159. P. 1789–1804.
- Mable B. “Why polyploidy is rarer in animals than in plants”: myths and mechanisms // *Biol. J. Linn. Soc.* 2004. V. 82. P. 453–466.
- Macqueen D.J., Johnston I.A. A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification // *Proc. Biol. Sci.* 2014. V. 281(1778). P. 20132881.
- Mallo M., Wellik D.M., Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan // *Dev. Biol.* 2010. V. 344. P. 7–15.
- Manousaki T., Feiner N., Begemann G. et al. Co-orthology of Pax4 and Pax6 to the fly eyeless gene: molecular phylogenetic, comparative genomic, and embryological analyses // *Evol. Dev.* 2011. V. 13. P. 448–459.
- Manousaki T., Qiu H., Noro M. et al. Molecular evolution in the lamprey genomes and its relevance to the timing of whole genome duplications // *Jawless Fishes of the World*. Vol. 1. Newcastle upon Tyne / Eds. Orlov A., Beamish R. Cambridge Scholars Publishing, 2011. P. 2–16.
- Martin K.J., Holland P.W. Enigmatic orthology relationships between Hox clusters of the African butterfly fish and other teleosts following ancient whole-genome duplication // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31(10). P. 2592–2611.
- Matsushita T., Yamaoka T., Otsuka S. et al. Molecular cloning of mouse paired-box-containing gene (Pax)-4 from an islet b cell line and deduced sequence of human Pax-4 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 242. P. 176–180.
- McCauley D.W., Bronner-Fraser M. Conservation of Pax gene expression in ectodermal placodes of the lamprey // *Gene*. 2002. V. 287(1–2). P. 129–139.
- McCauley D.W., Docker M.F., Whyard S. et al. Lampreys as diverse model organisms in the genomics era // *Bioscience*. 2015. V. 65. P. 1046–1056.
- McEwen G.K., Goode D.K., Parker H.J. et al. Early evolution of conserved regulatory sequences associated with development in vertebrates // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. e1000762.
- Mehta T.K., Ravi V., Yamasaki S. et al. Evidence for at least six Hox clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 16044–16049.
- Menke D.B., Guenther C., Kingsley D.M. Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs // *Development*. 2008. V. 135(15). P. 2543–2553.
- Meyer A., Van de Peer Y. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD) // *Bioessays*. 2005. V. 27(9). P. 937–945.
- Minguillon C., Nishimoto S., Wood S. et al. Hox genes regulate the onset of Tbx5 expression in the forelimb // *Development*. 2012. V. 139(17). P. 3180–3188.
- Miyashita T. Fishing for jaws in early vertebrate evolution: a new hypothesis of mandibular confinement // *Biol. Rev.* 2016. V. 91. P. 611–657.
- Moreau M., Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. V. 48(2–3). P. 75–84.
- Moriyama Y., Koshihara-Takeuchi K. Significance of whole-genome duplications on the emergence of evolutionary novelties // *Briefings in Functional Genomics*. 2018. V. 17(5). P. 329–338.
- Morris S.C., Caron J.-B. A primitive fish from the Cambrian of North America // *Nature*. 2014. V. 512(7515). P. 419–422.
- Muller G.B. Evo-devo: extending the evolutionary synthesis // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 943–949.
- Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F. et al. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates // *Development*. 2001. V. 128(18). P. 3521–3531.
- Myojin M., Ueki T., Sugahara F. et al. Isolation of Dlx and Emx gene cognates in an agnathan species, *Lampetra japonica*, and their expression patterns during embryonic and larval development: conserved and diversified regulatory patterns of homeobox genes in vertebrate head evolution // *J. Exp. Zool.* 2001. V. 15; 291(1). P. 68–84.
- Nakatani Y., Takeda H., Kohara Y. et al. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 1254–1265.
- Nei M. Gene duplication and nucleotide substitution in evolution // *Nature*. 1969. V. 221. P. 40–42.
- Neidert A.H., Virupannavar V., Hooker G.W. et al. Lamprey Dlx genes and early vertebrate evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 13; 98(4). P. 1665–1670.
- Noro M., Sugahara F., Kuraku S. Reevaluating Emx gene phylogeny: homopolymeric amino acid tracts as a po-

- tential factor obscuring orthology signals in cyclostome genes // *BMC Evol. Biol.* 2015. V. 15(1). P. 78.
- Northcutt R.G. The new head hypothesis revisited // *J. Exp. Zool.* 2005. V. 304B. P. 274–297.
- Nossa C.W., Havlak P., Yue J.-X. et al. Joint assembly and genetic mapping of the Atlantic horseshoe crab genome reveals ancient whole genome duplication // *Giga-science.* 2014. V. 3. P. 708–721.
- Oisi Y., Ota K.G., Kuraku S. Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates // *Nature.* 2013. V. 493. P. 175–180.
- Onimaru K., Kuraku S. Inference of the ancestral vertebrate phenotype through vestiges of the whole-genome duplications // *Brief Funct. Genomics.* 2018. V. 17(5). P. 352–361.
- Orr H.A. 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants' revisited // *Am. Nat.* 1990. V. 136. P. 759–770.
- Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K. et al. Concise review: *Pax6* transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // *Stem. Cells.* 2008. V. 26. P. 1663–1672.
- Ota K.G., Kuraku S., Kuratani S. Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest // *Nature.* 2007. V. 446. P. 672–675.
- Otto S.P. The evolutionary consequences of polyploidy // *Cell.* 2007. V. 131(3). P. 452–462.
- Pan D., Zhang L. Burst of young retrogenes and independent retrogene formation in mammals // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e5040.
- Parker H.J., Bronner M.E., Krumlauf R. An atlas of anterior hox gene expression in the embryonic sea lamprey head: Hox-code evolution in vertebrates // *Dev. Biol.* 2019a. V. 453(1). P. 19–33.
- Parker H.J., De Kumar B., Green S.A. et al. A Hox-TALE regulatory circuit for neural crest patterning is conserved across vertebrates // *Nat. Commun.* 2019b. V. 10. P. 1189.
- Parker H.J., Krumlauf R. Segmental arithmetic: summing up the Hox gene regulatory network for hindbrain development in chordates // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2017. V. 6(6). P. e286.
- Parker H.J., Piccinelli P., Sauka-Spengler T. et al. Ancient Pbx- Hox signatures define hundreds of vertebrate developmental enhancers // *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 637.
- Parker H.J., Sauka-Spengler T., Bronner et al. A reporter assay in lamprey embryos reveals both functional conservation and elaboration of vertebrate enhancers // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e85492.
- Pascual-Anaya J., D'Aniello S., Kuratani S. et al. Evolution of Hox gene clusters in deuterostomes // *BMC Dev. Biol.* 2013. V. 13. P. 26.
- Pascual-Anaya J., Sato I., Sugahara F. et al. Hagfish and lamprey Hox genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates // *Nat. Ecol. Evol.* 2018. V. 2. P. 859–866.
- Pasquier J., Braasch I., Batzel P. et al. Evolution of gene expression after whole-genome duplication: new insights from the spotted gar genome // *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 2017. V. 328. P. 709–721.
- Pievesan A., Antonaros F., Vitale L. et al. Human protein-coding genes and gene feature statistics // *BMC Res. Notes.* 2019. V. 12. P. 315.
- Plouhinec J.L., Sauka-Spengler T., Germot A. et al. The mammalian Crx genes are highly divergent representatives of the Otx5 gene family, a gnathostome orthology class of orthodenticle-related homeogenes involved in the differentiation of retinal photoreceptors and circadian entrainment // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 513–521.
- Pollard S.L., Holland P.W. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry // *Curr. Biol.* 2000. V. 10(17). P. 1059–1062.
- Postlethwait J., Amores A., Cresko W. et al. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome // *Trends Genet.* 2004. V. 20(10). P. 481–490.
- Postlethwait J.H., Woods I.G., Ngo-Hazelett P. et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes // *Genome Res.* 2000. V. 10(12). P. 1890–1902.
- Prescott S.L., Srinivasan R., Marchetto M.C. et al. Enhancer divergence and cis-regulatory evolution in the human and chimp neural crest // *Cell.* 2015. V. 163. P. 68–83.
- Prince Y., Joly L., Ekker M. et al. Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk // *Development.* 1998. V. 125. P. 407–420.
- Putnam N.H., Butts T., Ferrier D.E. et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype // *Nature.* 2008. V. 453. P. 1064–1071.
- Qiu H., Hildebrand F., Kuraku S. et al. Unresolved orthology and peculiar coding sequence properties of lamprey genes: the KCNA gene family as test case // *BMC Genomics.* 2011. V. 12(1). P. 325.
- Quiring R., Walldorf U., Kloter U. et al. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and Aniridia in humans // *Science.* 1994. V. 265. P. 785–789.
- Ravi V., Bhatia S., Shingate P. et al. Lampreys, the jawless vertebrates, contain three *Pax6* genes with distinct expression in eye, brain and pancreas // *Sci. Rep.* 2019. V. 9(1). P. 19559.
- Ravi V., Venkatesh B. The divergent genomes of teleosts // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2018. V. 6. P. 47–68.
- Ravi V., Lam K., Tay B.H. et al. Elephant shark (*Callorhynchus milii*) provides insights into the evolution of Hox gene clusters in gnathostomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 16327–16332.
- Robertson H.M., Wanner K.W. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 1395–1403.
- Ruvinsky I., Gibson-Brown J.J. Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution // *Development.* 2000. V. 127(24). P. 5233–5244.
- Sacerdot C., Louis A., Bon C. et al. Chromosome evolution at the origin of the ancestral vertebrate genome // *Genome Biol.* 2018. V. 19(1). P. 166.
- Sahoo T., Dzidic N., Strecker M.N. et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges // *Genet. Med.* 2017. V. 19(1). P. 83–89.
- Sánchez-Villagra M.R., Geiger M., Schneider R.A. The taming of the neural crest: a developmental perspective on the origins of morphological covariation in domesticat-

- ed mammals // Royal Soc. Open Sci. 2016. V. 3. P. 160107.
- Sansom R.S., Freedman K., Gabbott S.E. et al.* Taphonomy and affinity of an enigmatic Silurian vertebrate, *Jamoytius kerwoodi* White // Palaeontology. 2010. V. 53(6). P. 1393–1409.
- Sansom R.S., Gabbott S.E., Purnell M.A.* Unusual anal fin in a Devonian jawless vertebrate reveals complex origins of paired appendages // Biol. Lett. 2013. V. 9. P. 20130002.
- Santos M.E., Athanasiadis A., Leitao A.B. et al.* Alternative splicing and gene duplication in the evolution of the FoxP gene subfamily // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 237–247.
- Satoh N.* Chordate Origins and Evolution: The Molecular Evolutionary Road to Vertebrates. San Diego: Academic Press. 2016.
- Sauka-Spengler T., Bronner-Fraser M.* Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective // Genesis. 2008. V. 46. P. 673–682.
- Scannell D.R., Butler G., Wolfe K.H.* Yeast genome evolution – the origin of the species // Yeast. 2007. V. 24(11). P. 929–942.
- Scannell D.R., Frank A.C., Conant G.C. et al.* Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104(20). P. 8397–8402.
- Schwager E.E., Sharma P.P., Clarke T. et al.* The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution // BMC Biol. 2017. V. 15(1). P. 62.
- Sharman A.C.* Some new terms for duplicated genes // Semin. Cell Dev. Biol. 1999. V. 10. P. 561–563.
- Shimeld S.M., Donoghue P.C.J.* Evolutionary crossroads in developmental biology: cyclostomes (lamprey and hagfish) // Development. 2012. V. 139. P. 2091–2099.
- Shu D.-G., Luo H.-L., Conway Morris S. et al.* Lower Cambrian vertebrates from south China // Nature. 1999. V. 402(6757). P. 42–46.
- Shu D.-G., Morris S.C., Han J. et al.* Head and backbone of the early Cambrian vertebrate *Haikouichthys* // Nature. 2003. V. 421(6922). P. 526–529.
- Sikosek T., Chan H.S., Bornberg-Bauer E.* Escape from adaptive conflict follows from weak functional trade-offs and mutational robustness // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 14888–14893.
- Simakov O., Marlétaz F., Yue J.X. et al.* Deeply conserved synteny resolves early events in vertebrate evolution // Nat. Ecol. Evol. 2020. V. 4(6). P. 820–830.
- Slack J.M., Tannahill D.* Noggin the dorsalizer // Nature. 1993. V. 361. P. 498–499.
- Smith J.J., Keinath M.C.* The sea lamprey meiotic map improves resolution of ancient vertebrate genome duplications // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1081–1090.
- Smith J.J., Kuraku S., Holt C. et al.* Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution // Nat. Genet. 2013. V. 45. P. 415–421.
- Smith W.C., Knecht A.K., Wu M. et al.* Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm // Nature. 1993. V. 361. P. 547–549.
- Smith J.J., Timoshevskaya N., Ye C. et al.* The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution // Nat. Genet. 2018. V. 50. P. 270–277.
- Smith W.C., Harland R.M.* Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos // Cell. 1992. V. 70. P. 829–840.
- Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J. et al.* Polyploidy and angiosperm diversification // Am. J. Bot. 2009. V. 96(1). P. 336–348.
- Soltis D.E., Bell C.D., Kim S. et al.* Origin and early evolution of angiosperms // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1133. P. 3–25.
- Song X., Tang Y., Wang Y.* Genesis of the vertebrate FoxP subfamily member genes occurred during two ancestral whole genome duplication events // Gene. 2016. V. 588(2). P. 156–162.
- Song X., Wang Y., Tang Y.* Rapid diversification of FoxP2 in teleosts through gene duplication in the teleost-specific whole genome duplication event // PLoS One. 2013. V. 8. P. e83858.
- Spring J.* Vertebrate evolution by interspecific hybridization – are we polyploid? // FEBS Lett. 1997. V. 400. P. 2–8.
- Stoltzfus A.* On the possibility of constructive neutral evolution // J. Mol. Evol. 1999. V. 49. P. 169–181.
- Sugino R.P., Innan H.* Selection for more of the same product as a force to enhance concerted evolution of duplicated genes // Trends Genet. 2006. V. 22. P. 642–644.
- Takahashi H., Takahashi K., Liu F.C.* FOXP genes, neural development, speech and language disorders // Adv. Exp. Med. Biol. 2009. V. 665. P. 117–129.
- Tang H., Wang X., Bowers J.E. et al.* Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps // Genome Res. 2008. V. 18(12). P. 1944–1954.
- Tank E.M., Dekker R.G., Beauchamp K. et al.* Patterns and consequences of vertebrate *Emx* gene duplications // Evol. Dev. 2009. V. 11(4). P. 343–353.
- Taylor J.S., Van de Peer Y., Braasch I. et al.* Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish // Philos Trans R. Soc. Lond B Biol. Sci. 2001. V. 356. P. 1661–1679.
- Valerius M.T., Li H., Stock J.L. et al.* Gsh-1: a novel murine homeobox gene expressed in the central nervous system // Dev. Dyn. 1995. V. 203(3). P. 337–351.
- Van de Peer Y., Maere S., Meyer A.* The evolutionary significance of ancient genome duplications // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10(10). P. 725–732.
- Van de Peer Y., Mizrachi E., Marchal K.* The evolutionary significance of polyploidy // Nat. Rev. Genet. 2017. V. 18. P. 411–424.
- Vanneste K., Baele G., Maere S. et al.* Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous-Paleogene boundary // Genome Res. 2014. V. 24(8). P. 1334–1347.
- Veitia R.A.* Gene dosage balance: deletions, duplications and dominance // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 33–35.
- Vuolo F., Mentink R.A., Hajheidari M. et al.* Coupled enhancer and coding sequence evolution of a homeobox gene shaped leaf diversity // Genes Dev. 2016. V. 30. P. 2370–2375.
- Wagner A.* The molecular origins of evolutionary innovations // Trends Genet. 2011. V. 27(10). P. 397–410.

- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics // *Genetics*. 2014. V. 197. P. 795–808.
- Wittbrodt J., Meyer A., Scharl M. More genes in fish? // *Bioessays*. 1998. V. 20. P. 511–515.
- Woolfe A., Elgar G. Comparative genomics using Fugu reveals insights into regulatory subfunctionalization // *Genome Biol*. 2007. V. 8(4). P. R53.
- Xanthos J.B., Kofron M., Tao Q. et al. The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer // *Development*. 2002. V. 129(17). P. 4027–4043.
- Yang M., Wang Y., Wang X. et al. Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Foxp1a/1b/2: evidence for their involvement in the activation of peripheral blood lymphocyte subpopulations // *Fish Shellfish Immunol*. 2010. V. 28. P. 289–295.
- York J.R., McCauley D.W. Functional genetic analysis in a jawless vertebrate, the sea lamprey: insights into the developmental evolution of early vertebrates // *J. Exp. Biol*. 2020. V. 223(Pt Suppl. 1). P. jeb206433.
- Zhang G., Fang X., Guo X. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // *Nature*. 2012. V. 490. P. 49–54.
- Zhang H., Ravi V., Tay B.H. et al. Lampreys, the jawless vertebrates, contain only two *ParaHox* gene clusters // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114(34). P. 9146–9151.
- Zhang X., Zhang Y., Zheng X. et al. A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Mar. Biotechnol*. 2013. V. 15. P. 275–312.
- Zhang X.G., Hou X.G. Evidence for a single median fin-fold and tail in the Lower Cambrian vertebrate, *Haikouichthys ercaicunensis* // *J. Evol. Biol*. 2004. V. 17. P. 1162–1166.

Genome Duplications as the Basis of the Vertebrates Evolutionary Success

A. V. Bayramov^{1,*}, G. V. Ermakova¹, A. V. Kuchryavy², and A. G. Zaraisky¹

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

²*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: andrbayr@gmail.com

Vertebrates, often considered as the most sophisticatedly organized animals, have a number of unique morphological features that ensured their evolutionary stability and success. According to the most common view, the genetic basis of these innovations was the whole genome duplications that occurred in the early stages of vertebrate evolution. One of the important results of such duplications was the emergence of additional copies of regulatory genes. Having been removed from the constraining pressure of natural selection, these copies were able to modify their structure and functions, which then resulted in various modifications of embryonic development and structure of the definitive organisms. For example, due to such ancient genomic duplications about 35% of human genes are represented by at least two homologous copies. The idea suggesting genome duplications at the early stages of vertebrate evolution was first put forward in 1970s, however, questions about their number, scale (whole-genome or local) and timing in the evolution are still actively discussed. In recent years (2018–2020), due to the rapid development of methods for processing of big data of high-throughput genome sequencing in different lineages of vertebrates and their closest relatives, cephalochordates and tunicates, a number of comparative studies aimed at identifying groups of synteny in genomes of different evolutionary lines and reconstruction of ancestral vertebrates chromosomes were obtained. As a result, several models describing possible scenarios of genome duplications in early vertebrate evolution have been proposed. At the same time, laboratory studies, focused on a detailed study of the expression and functional properties of individual families of regulatory genes in different groups of vertebrates, are being actively carried out. As a result, a lot of new information was collected about the molecular mechanisms of the embryonic development in such hitherto poorly studied representatives of the evolutionarily ancient vertebrates branches as cyclostomes, cartilaginous fish and sturgeons. In this review, we try to consider modern concepts of the mechanisms and consequences of ancient genomic duplications with recent experimental data and currently proposed models of vertebrate genome evolution.

Keywords: genome duplications, vertebrates, allopolyploidy, autopolyploidy, subfunctionalization, neofunctionalization, cyclostomes, lampreys, sturgeons, bony fishes, *Hox*, *Noggin*, *Pax*, *ParaHox*, *WGD*, *FoxP*, *CRD*

РАЗВИТИЕ 3D ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АГРЕГАТОВ
В ЖЕЛУДОЧКАХ МОЗГА ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ© 2021 г. К. К. Сухинич^а, *, К. М. Шакирова^б, Э. Б. Дашинимаев^{а, б}, М. А. Александрова^а^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия^бФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

*e-mail: sukhinichkirill@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2021 г.

После доработки 29.01.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2021 г.

Церебральные органоиды – это трехмерные клеточные культуры, формирующиеся из специфичных для мозга типов клеток, возникающих из эмбриональных или плюрипотентных стволовых клеток. Органоиды дают возможность изучения ранних этапов развития мозга и заболеваний центральной нервной системы. Однако моделирование органоидов связано с рядом пока нерешенных задач. Методики получения органоидов включают сложный процесс культивирования клеток, требующий специальных сред, ростовых факторов, и зачастую, использование биореактора. Даже в стандартизованных условиях формируются структуры различные по морфологии: от неорганизованных клеточных агрегатов, до структурированных мини мозгов, которые и отбираются для изучения. По естественным причинам органоиды, выращенные *in vitro* не имеют кровоснабжения, что ограничивает их развитие. Мы попытались получить церебральные агрегаты, подобные органоидам, в модели *in vivo*, где обеспечивается рост сосудов и кровоснабжение ткани, для чего трансплантировали суспензию клеток из неокортекса эмбриона мыши в боковые желудочки мозга взрослых мышей. Поэтому, средой для культивирования служила спинномозговая жидкость, а биореактором – боковые желудочки мозга, где она циркулирует. Результаты показали, что неокортекс от Э14.5 является подходящим источником стволовых/прогениторных клеток, которые самоорганизуются в трехмерные агрегаты и васкуляризируются *in vivo*. Агрегаты состояли из центрального слоя зрелых нейронов, свободной от клеток маргинальной зоны и пограничной глиальной мембраны, что имело сходство с церебральными органоидами. Таким образом, для получения васкуляризованных клеточных агрегатов, напоминающих церебральные органоиды, могут быть использованы боковые желудочки мозга взрослой мыши.

Ключевые слова: церебральные органоиды, неокортекс, трансплантация, GFP, иммуногистохимия, ОТ-ПЦР

DOI: 10.31857/S047514502103006X

ВВЕДЕНИЕ

Изучение развития мозга в нормальных и патологических состояниях проводится главным образом на лабораторных грызунах, но, когда речь заходит о мозге человека, превращается в очень сложную задачу, поскольку эксперименты *in vivo* проводить невозможно. Частично этот барьер можно преодолеть, используя иммунодефицитных животных для трансплантации нейральных клеток человека, которые достаточно длительное время могут развиваться в мозге реципиента, что позволяет исследовать их дифференцировку (Nap et al., 2013; Mansour et al., 2018). Множество работ по развитию мозга млекопитающих проводится на адгезивных культурах *in vitro* (Коо et al., 2019). Однако при 2D культивировании не формируются трехмерная организация нервных и глиальных

клеток и специфические пространственные межклеточные взаимодействия характерные для развивающегося мозга (Pacitti et al., 2019). Не так давно была продемонстрирована возможность создания трехмерных органоидов *in vitro* (Watanabe et al., 2005; см. обзор Sukhinich, Aleksandrova, 2020). Церебральные органоиды представляют собой самоорганизующиеся клеточные трехмерные агрегаты, состоящие из специфичных для мозга типов клеток, возникших из эмбриональных или плюрипотентных стволовых клеток (Qian et al., 2019). В органоидах воспроизводятся морфо-генетические процессы ранних этапов развития, в том числе специфическая миграция клеток и цитоархитектоника эмбрионального мозга (Eiraku et al., 2011; Mariani et al., 2012; Todd et al., 2013). Модель органоида также оказалась успешной для изучения ряда

заболеваний центральной нервной системы, среди них, например, микроцефалия (Lancaster et al., 2013) и даже болезнь Альцгеймера (Gonzalez et al., 2018). Однако, несмотря на широкий интерес к моделированию органоидов, технология их воспроизводства связана с рядом пока не решенных задач. Первое, это сложный, многоэтапный процесс культивирования клеток, в результате которого только некоторые органоиды приобретают характерную гистотипическую организацию, и второе, отсутствие в органоидах васкуляризации и некоторых типов клеток, специфичных для мозга, что ограничивает его рост. Интересным подходом может быть выращивание органоидов в “естественной среде микроокружения”, а именно, в полостях желудочков мозга экспериментальных животных *in vivo*. В этой модели можно избежать необходимости в специальных питательных средах, так как они заменяются спинномозговой жидкостью, которая является биологически активной средой (Rahimi, Woehrer, 2017), оказывает важное регулирующее влияние на прогениторные клетки в процессе нейрогенеза коры головного мозга (Lehtinen et al., 2011), кроме того возможно использовать уже коммитированные типы клеток. Целью настоящего исследования было изучение способности к самоорганизации в трехмерные агрегаты, подобные органоидам, трансплантированных стволовых и прогениторных клеток эмбрионального неокортекса при их развитии в ликворе желудочков мозга взрослой мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Трансгенных гетерозиготных мышей линии C57BL/6-Tg(CTG-EGFP)10sb/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) и мышей линии C57Bl/6 использовали для получения датированной беременности и трансплантации. Утро, когда была обнаружена вагинальная пробка, было отмечено как Э0.5. На сроках развития Э14.5 ($n = 4$) и Э19.5 ($n = 4$) из эмбрионов трансгенных мышей EGFP выделяли ткань фронтальной части неокортекса.

ОТ-ПЦР

Выделение РНК проводили согласно протоколу к коммерческому набору компании “Qiagen” RNeasy Kit (Qiagen, #74004) с использованием “Qiagen” DNase Kit (Qiagen, #79254) для удаления остатков геномной ДНК. Лизис образцов неокортекса проводили без предварительной гомогенизации органа. Для получения первой цепи кДНК на матрице выделенной РНК использовали коммерческий набор компании “Евроген” MMLV RT kit (Evrogen, #SK021). Ввиду разного расположения на транскрипте мишеней амплификации для синтеза кДНК использовали смесь случайных де-

кануклеотидных праймеров и олиго(dT) праймера в соотношении 1 : 1 (праймеры включены в набор MMLV RT kit). Для одной реакции брали 1 мкг РНК. Для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени были подобраны праймеры с помощью онлайн ресурса NCBI Primer-BLAST (табл. 1). Преимущественно подбирали праймеры к последовательностям, лежащим на стыке экзонов для избежания амплификации геномной ДНК. ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad). Для ОТ-ПЦР использовали готовую коммерческую смесь qPCRmix-HSSYBR компании “Евроген” (Evrogen, #PK147L). Оценку экспрессии проводили по методу $2\Delta Ct$, где в качестве контрольного образца использовалась культура иммортализованных мышечных фибробластов 3T3-NIH. Нормализацию результатов проводили по экспрессии генов домашнего хозяйства GAPDH и ACTB. Значения $2\Delta Ct$ использованы для расчета изменения уровня экспрессии изучаемых генов: $R = 2^{-\Delta Ct}$, для удобства построения графиков полученные данные были представлены в формате $\log_{10}(R)$.

Трансплантация

При приготовлении суспензии клеток для трансплантации ткань неокортекса, полученную от мышей Э14.5 (число эмбрионов, $n = 4$), диссоциировали с использованием раствора Аккутазы (Sigma-Aldrich, США) и промывали в растворе Хэнкса (Gibco). Объем каждого трансплантата составлял 1.5 мкл и содержал 300000 клеток. Взрослых мышей C57Bl/6 ($n = 9$) анестезировали изофлураном. Операционная поверхность была выбрита, кожа между ушами разрезана, кости черепа истончены. Суспензию фронтальной неокортекса вводили стереотаксически шприцем Гамильтона. Инъекции выполнялись в следующих координатах относительно Брегмы: +0.3 мм (антериопостериально), 1 мм (латерально), 1.5 мм (дорсовентрально). Иммуносупрессия не проводилась.

Приготовление срезов

На 5-й, 30-й и 90-й дни после трансплантации выполняли транскардиальную перфузию с использованием фосфатно-солевого буфера (Phosphate buffered saline, PBS) и 4% параформальдегида. Каждый мозг был извлечен из черепа и инкубирован в течение ночи в том же фиксаторе. Затем мозг промывали в PBS и переносили в 30% сахарозу на PBS. Коронарные срезы получали с помощью криостата (Leica CM1900), толщина срезов составляла 40 мкм. Тот же протокол был использован для мозга эмбрионов мыши Э14.5. Срезы хранили в растворе криопротектора при -20°C .

Таблица 1. Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность, 5'–3'
GAPDH	Fv: TGCACCACCAACTGCTTAGC Rv: GGCATGGACTGTGGTCATGAG
ACTB	Fv: CCCTGAACCCTAAGGCCAAC Rv: ATGGCTACGTACATGGCTGG
DCX	Fv: CCCCATGTGTGTGAGGTGTT Rv: GCTCTTTGGCTGCCAGTAT
GFAP	Fv: TGAATCGCTGGAGGAGGAGA Rv: GCCACTGCCTCGTATTGAGT
NES	Fv: GGCTGTATTCCTCCATCG Rv: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
NEUN	Fv: GGATTCGGGTCGTAACCTTC Rv: GGC GTGACCATCTTCTTGTT
PAX6	Fv: ACCCAAGAGCAGATTGAGGC Rv: TTGGCTGCTAGTCTTTCCCG
SOX2	Fv: TGC GCGCTCTGCACAT Rv: GAAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
SYP	Fv: CCAATCAGATGTAATCTGGTCAGT Rv: AGGCCTTCTCTTGAGCTCTT
TUBB3	Fv: CAGCGGCAACTATGTAGGGG Rv: CCAGGTTCCAAGTCCACCAG

Иммуногистохимия

Предметные стекла со срезами инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в блокирующем растворе: смеси 5% нормальной козьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 0.3% Triton X-100 (Triton) и 0.01 М PBS (pH 7.4). После этого инкубировали в течение ночи при 4°C в смеси блокирующего раствора и первичных антител. Были использованы следующие антитела: кроличьи антитела против NeuN (Abcam, ab104225, 1 : 500); кроличьи антитела против GFAP (Abcam, ab7260, 1 : 800); куриные антитела против GFP (MolecularProbes, A-11122, 1 : 500), кроличьи антитела против Sox2 (Abcam, ab92494, 1 : 500); кроличьи антитела против DCX (Abcam, ab18723, 1 : 800); кроличьи антитела против Pax6 (Abcam, ab195045, 1 : 500); кроличьи антитела против beta-III tubulin (Abcam, ab18207, 1 : 500); кроличьи антитела против Synaptophysin (Abcam, ab32127, 1 : 600). Затем срезы промывали и инкубировали в течение 2 ч в смеси 0.3% Triton X-100 (Triton), 0.01 М PBS (pH 7.4) и следующих вторичных антител: козы антитела против IgY цыпленка (Abcam, ab150169, AlexaFluor488, 1 : 600), и козы антитела против IgG кролика (Abcam, ab150080, AlexaFluor 594, 1 : 600). Для визуализации сосудов срезы окрашивали лектином (Lycopersicon Esculentum) меченым флуорохромом DyLight® 594 (Vector Laboratories, DL-1177-1). Затем срезы промывали в PBS

и ядра окрашивали раствором DAPI (2 мкг/мл, Sigma, D9542). Гистологические изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа BZ-9000E (Keyence, Япония).

Статистический анализ

ОТ-ПЦР в реальном времени для каждого образца проводился в 4 технических повторах. Для оценки различий между паттернами экспрессии в клетках Э14.5 и Э19.5 использовали критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика клеток эмбрионального неокортекса

Для выбора наиболее подходящего материала для трансплантации было проведено исследование неокортекса эмбрионов двух стадий развития Э14.5 и Э19.5. Метод количественного ОТ-ПЦР в реальном времени показал, что на стадии Э19.5 происходит статистически значимое снижение маркеров стволовых клеток Sox2 и тенденция к снижению Nes (nestin). При этом происходит статистически значимое повышение экспрессии NeuN и Syp (synaptophysin) по сравнению с Э14.5, что свидетельствует о процессах дифференцировки в нейроны. Наиболее важным показателем является

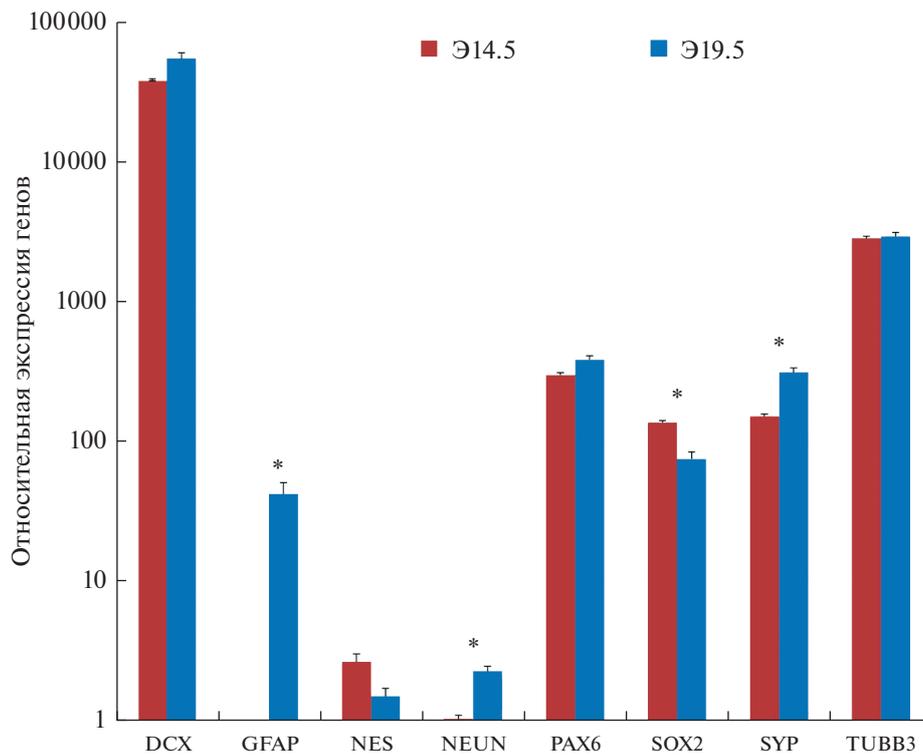


Рис. 1. Сравнение экспрессии нейральных маркеров в клетках мозга эмбрионов мыши на стадиях Э14.5 и Э19.5. На стадии Э19.5 клетки становятся более зрелыми и начинается глиогенез. Данные отображены в формате $\text{Log}_{10}(R)$, где $R = 2^{-2\Delta\text{Ct}}$. * – $p < 0.05$ по критерию Уилкоксона–Манна–Уитни, разница в экспрессии статистически значима.

изменение экспрессии мРНК гена астроцитов – GFAP, который на Э14.5 в нейрогенной фазе дифференцировки вообще не экспрессировался, а на Э19.5, в глиогенной фазе, показывает высокий уровень (рис. 1). Стоит отметить, что на обоих сроках наблюдается стабильная экспрессия маркера недифференцированных нейронов: Dcx (doublecortin) и Tubb3 (beta-III tubulin). Для подтверждения малодифференцированного статуса неокортекса Э14.5 было проведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с использованием нейрональных маркеров (рис. 2). Результаты ИГХ анализа показали, что клетки с маркерами нейральных стволовых клеток (НСК) Pax6 и Sox2 распределены строго в V-SVZ (вентрикулярно-субвентрикулярная зона) и отсутствуют в других слоях коры. Мигрирующие нейробласты, экспрессирующие DCX, занимают промежуточную зону коры мозга. В зоне кортикальной пластинки располагаются нейробласты, экспрессирующие маркер ранних нейронов beta-III tubulin. За пределами V-SVZ все нейроны экспрессируют маркер синаптических контактов synaptophysin, поскольку синаптические везикулы уже присутствуют в растущих аксонах и их окончаниях, несмотря на то, что стабильных синапсов на этой стадии развития еще нет. Ядерный маркер зрелых нейронов NeuN экспрессируется в клетках на

очень низком уровне, что, свидетельствует о малом числе дифференцированных нейронов. Таким образом, низкий уровень дифференцировки клеток эмбрионального неокортекса Э14.5, а также отсутствие в нем астроцитов делает его более подходящим материалом для трансплантации по сравнению с неокортексом стадии Э19.5.

Клетки эмбрионального неокортекса формируют трехмерные агрегаты после трансплантации в желудочек мозга мышей

На момент трансплантации клетки в суспензии были ошарены, располагались единично или образовывали небольшие агрегаты. После трансплантации суспензии охарактеризованных клеток эмбрионального неокортекса мыши (стадия Э14.5) в желудочек мозга взрослых мышей морфологическое исследование проводили через 5, 30, 90 сут после операции. Через 5 сут было показано присутствие трансплантата в желудочке мозга взрослых мышей (рис. 3). Однако на таком раннем сроке трансплантаты были еще плохо интегрированы в ткань, что приводило к “выпадению” ряда трансплантатов при работе со свободноплавающими срезами. Тем не менее, удалось показать, что пересаженные клетки располагаются именно в боковом желудочке мозга, они не “вымываются”

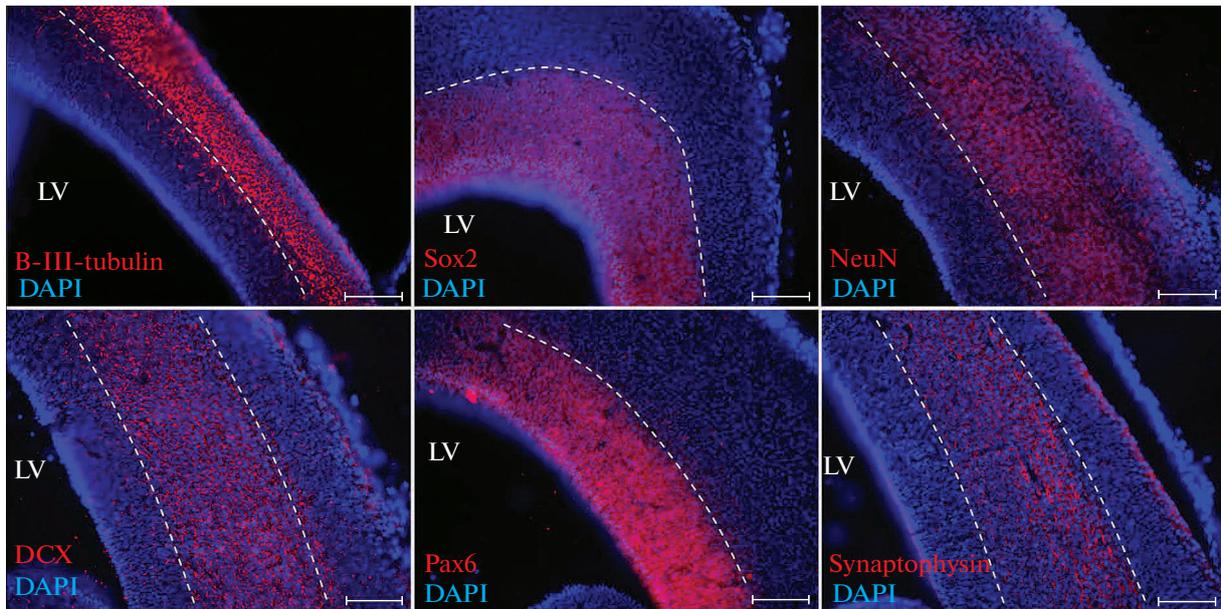


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование неокортекса эмбриона мыши стадии Э14.5. Незрелые нейроны ($\text{Beta-III-tubulin}^+$) находятся в кортикальной пластинке. Нейробласты DCX^+ занимают интермедиальную зону, в их аксонах выявляется синаптофизин (Synaptophysin). Нейральные стволовые клетки (Sox2^+ , Pax6^+) выявляются только в вентрикулярной и субвентрикулярной зоне. Зрелые нейроны (NeuN^+) находятся в кортикальной пластинке. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

спинномозговой жидкостью, и уже формируют объемный трансплантат, в котором клетки расположены хаотично. ИГХ анализ позволил обнаружить, что на данном сроке клетки трансплантата имеют положительную реакцию к DCX , что указывает на процессы миграции клеток внутри клеточного агрегата.

К 30 сут после операции трансплантаты значительно увеличивались в размере, и мигрирующие DCX^+ клетки уже не выявлялись. Несмотря на индивидуальные различия в размерах, трансплантаты уже имели четкую цитоархитектонику. В центральной части трансплантата группировались зрелые нейроны, положительные к маркеру NeuN (рис. 4), в то время как по периферии была определена маргинальная зона без NeuN^+ нейронов, подобная первому слою коры мозга. На этом сроке исследования положительные к GFAP астроциты были равномерно распределены по трансплантату (рис. 5). Морфологически было выявлено вращение сосудов в трансплантат.

На 90 сут трансплантаты были хорошо развиты. Положительных к DCX^+ нейробластов в них выявлено не было, что свидетельствовало о завершении миграции клеток и процессов дифференцировки. Дифференцированные NeuN^+ нейроны распределялись в центральной части трансплантата. Они располагались менее плотно в центре и плотнее на периферии центральной области. По размерам ядер клеток можно предположить, что

крупные нейроны, находящиеся на периферии центральной области являются нейронами V–VI слоя коры, которые формируются в первую очередь. На периферии трансплантата была выявлена зона без NeuN^+ клеток, соответствующая первому слою коры (рис. 6). Окрашивание на маркер синаптических контактов synaptophysin было достаточно равномерно по ткани трансплантата (рис. 7). Также равномерно по трансплантату были распределены Sox2^+ клетки (рис. 8). Распределение астроцитов (GFAP^+) имело характерный паттерн: равномерное распределение по трансплантату и формирование зоны пограничной глиальной мембраны (glia limitans) на границе между трансплантатом и желудочком мозга реципиента. Формирования рубца на месте контакта трансплантата и реципиента не выявлялось (рис. 9). Помимо структурной организации, была выявлена обширная васкуляризация трансплантата кровеносными сосудами со стороны мозга реципиента (рис. 10). Одновременно было обнаружено, что в области контакта трансплантата с субвентрикулярной зоной взрослого мозга идет миграция DCX^+ клеток, причем вдоль сосудов. Можно предположить, что это недифференцированные нейроны, возникшие из собственных эндогенных стволовых клеток реципиента (рис. 11). Миграции клеток из трансплантата в ткань мозга реципиента не было выявлено ни на одном сроке наблюдения. Наличие цитоархитектоники и отсутствие миграции в ткань мозга реципиента указыва-

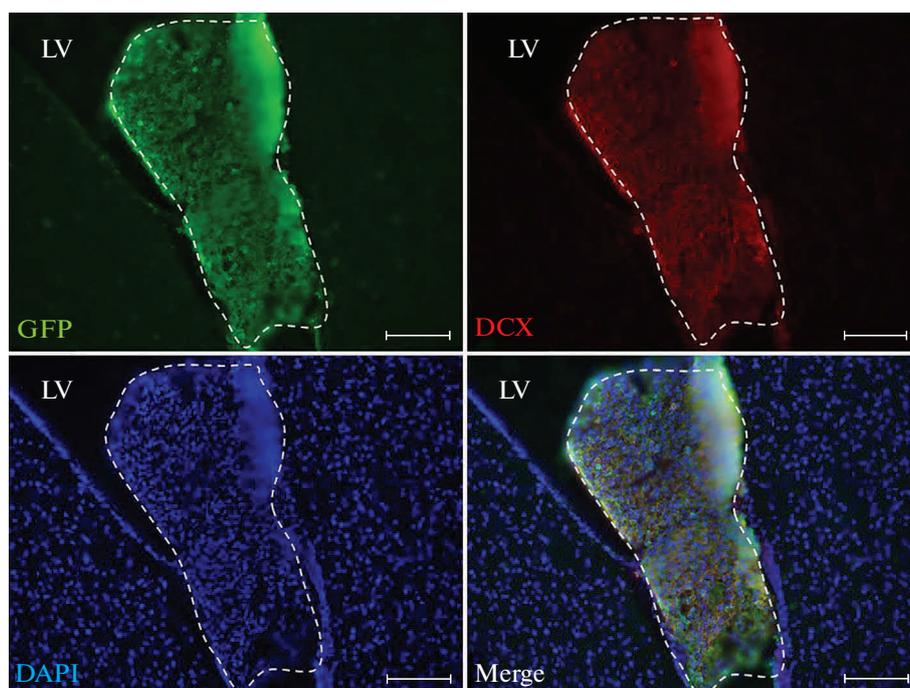


Рис. 3. Трансплантат клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) через 5 сут после пересадки в желудочек мозга мыши. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток трансплантата к маркеру нейробластов DCX. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

ет на то, что полученные трансплантаты представляют собой структуры напоминающие органоиды.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы пытались смоделировать адекватные условия для выращивания церебральных 3D агрегатов, используя трансплантацию стволовых и прогениторных клеток эмбрионального неокортекса мышей в латеральные желудочки мозга взрослых мышей, где циркулирует биологически активная спинномозговая жидкость и возможно кровоснабжение со стороны мозга реципиента (Lehtinen et al., 2011; Rahimi, Woehrer, 2017). Следует заметить, что полости боковых желудочков мозга, благодаря их микроокружению, неоднократно использовали для трансплантации разных типов нейральных и ненейральных клеток. Каждая научная группа ставила конкретную задачу в связи с тем, что или клетки плохо растут в паренхиме, или из-за необходимости попадания продуктов синтеза клеток непосредственно в спинномозговую жидкость (Freed et al., 1990; Zheng et al., 2006; Henzi et al., 2018; Barati et al., 2019). В нашу задачу входила отработка модели для изучения самоорганизации и васкуляризации неокортикальных клеток, выделенных из эмбрионального мозга и культивированных в латеральном желудочке взрослых мышей. Для трансплантации были выбраны клетки неокортекса эмбрионов GFP мы-

шей Э14.5, которые находятся на стадии нейрогенеза и, в отличие от некоммитированных эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток не могут формировать тератомы (Gutierrez-Aranda et al., 2010). Используя ОТ-ПЦР в реальном времени мы определили состояние дифференцировки клеток в неокортексе эмбрионов стадий Э14.5 и Э19.5. По экспрессии мРНК генов стволовых клеток *Pax6*, *Sox2*, *Nes*; недифференцированных нейронов *Dcx*, *Tubb3*; дифференцированных нейронов *NeuN*; астроцитов *GFAP* и синаптофизина *Syp* (начинает экспрессироваться в недифференцированных нейронах) было показано, что предпочтительнее для трансплантации клетки коры Э14.5. В них высокий уровень экспрессии маркеров стволовых клеток, отсутствуют дифференцированные нейроны и нет глиальных клеток. Результаты ОТ-ПЦР мы подтвердили иммуногистохимическим анализом срезов, где была получена картина распределения разных типов клеток по слоям в неокортексе Э14.5 эмбрионов, что в целом соответствовало ранее проведенными исследованиями (Englund et al., 2005; Hori et al., 2014; Lodato, Arlotta, 2015; Güven et al., 2019). Следующим шагом в разработке технологии получения церебральных 3D агрегатов *in vivo* была непосредственно трансплантация клеток эмбрионального неокортекса мышей в желудочек мозга взрослых мышей. Выделенные фронтальные отделы неокортекса Э14.5 использовали для приго-

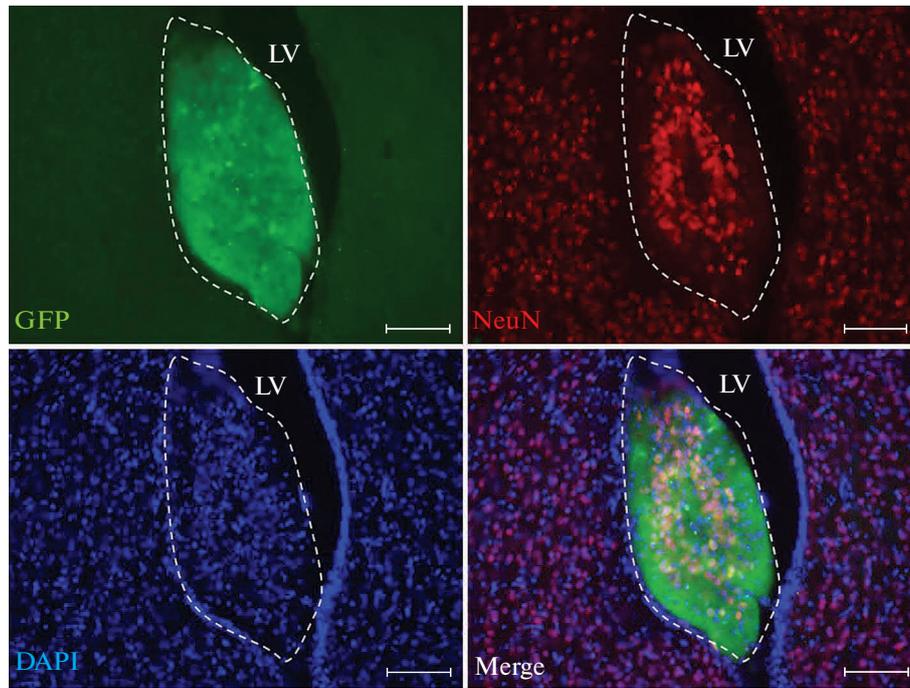


Рис. 4. Структура трансплантата из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента (30 сут). Положительная иммуногистохимическая реакция клеток к маркеру зрелых нейронов NeuN. Плотное скопление клеток в центральной области, на периферии образуется маргинальная зона. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

товления суспензии, в процессе обработки клетки теряли контакты и ошаривались. В результате полученная суспензия состояла из небольших агрегатов и отдельных округлых клеток не имеющих отростков. Нам удалось обнаружить, что уже через 5 сут после операции, в полости латерального желудочка формируется клеточный агрегат, в котором выявляются мигрирующие нейробласты. К 30 сут трансплантат состоял из зрелых нейронов и астроцитов. Нами было установлено, что для успешного развития 3D кортикальных агрегатов в желудочках мозга необходим длительный срок, в нашем эксперименте 90 сут. Согласно данным литературы для развития церебральных органоидов в системе *in vitro* также требуется длительный срок, около 60 сут (Eiraku et al., 2008; Fan et al., 2019), а при трансплантации стволовых клеток в желудочек мозга молодых крыс, рост трансплантата заканчивается через 60 дней (Pothayee et al., 2018). В нашем эксперименте было установлено, что к 90 сут в клетках 3D церебрального трансплантата экспрессируется маркер зрелых нейронов NeuN⁺. Цитоархитектоника трансплантата выглядела следующим образом: дифференцированные нейроны располагались только в центральной части трансплантата, на периферии выявлялась зона без клеток, что напоминало маргинальную зону или первый слой неокортекса. Судя по литературным источникам (Pothayee et al., 2018), данный

факт ранее не наблюдался в трансплантатах, полученных из кортикальных НСК. На периферии трансплантата формировалась зона пограничной мембраны, которая, как и в нормальном мозге, была сформирована GFAP⁺ астроцитами. Пограничная мембрана трансплантата во многих местах соприкасалась с эпендимой стенки желудочка, однако, глиального рубца между тканями донора и реципиента не возникало, что констатировали и другие исследователи (Pothayee et al., 2018). Мы наблюдали описанное другими авторами проникновение DCX⁺ клеток реципиента в ткань трансплантата (Pothayee et al., 2018), но не выявили миграции GFP клеток из трансплантата в ткань реципиента, также описанную этими авторами. В трансплантатах были выявлены клетки, экспрессирующие Sox2. Согласно данным литературы Sox2 обычно считают маркером нервных стволовых клеток, которые распределяются в разных областях эмбрионального и взрослого мозга. Однако, его экспрессия также была описана и в дифференцированных нейронах в различных областях нервной системы (особенно в таламусе, стриатуме, неокортексе) (Ferri et al., 2004). Кроме того, есть данные об экспрессии Sox2 в отдельных астроцитах (Sahouy et al., 2008). Таким образом, обнаруженная нами в некоторых клетках трансплантатов экспрессия Sox2 не может достоверно говорить о том, что в нем присутствуют стволо-

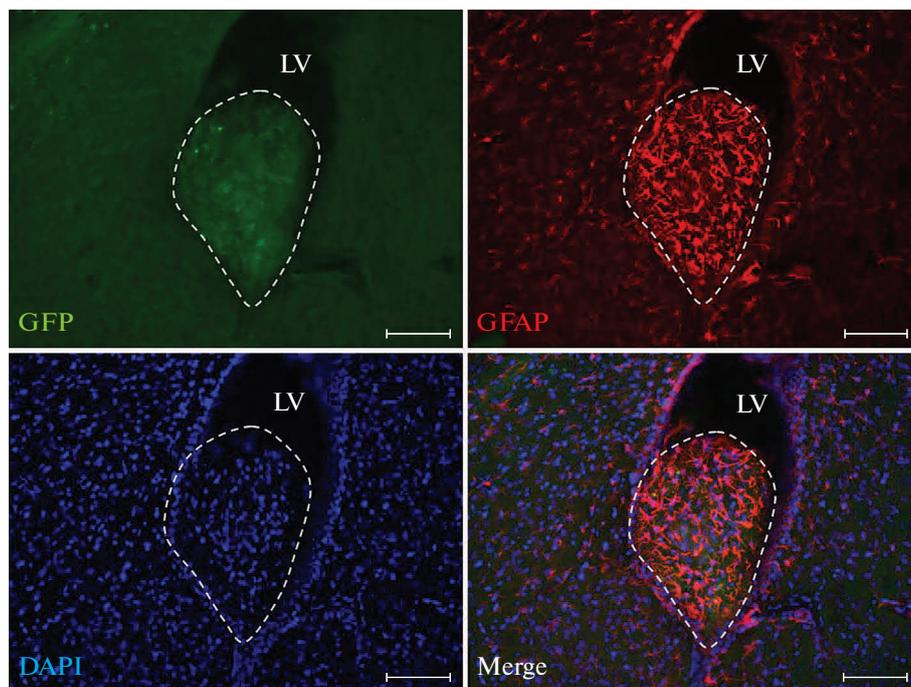


Рис. 5. Структура трансплантата из клеток неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента (30 сут). GFAP⁺ астроциты распределены равномерно по трансплантату. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

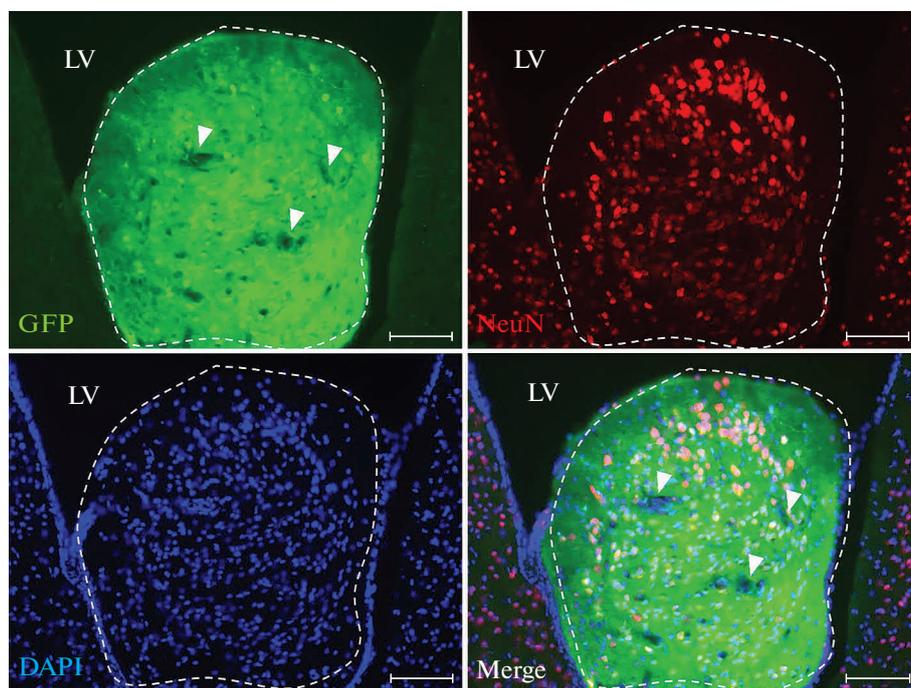


Рис. 6. Структура трансплантата из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) через 90 сут после пересадки в желудочек мозга мыши. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток трансплантата к маркеру зрелых нейронов NeuN. Нейроны занимают центральную область, по периферии образуется маргинальная зона. В трансплантате видны сосуды (отмечены стрелками). Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

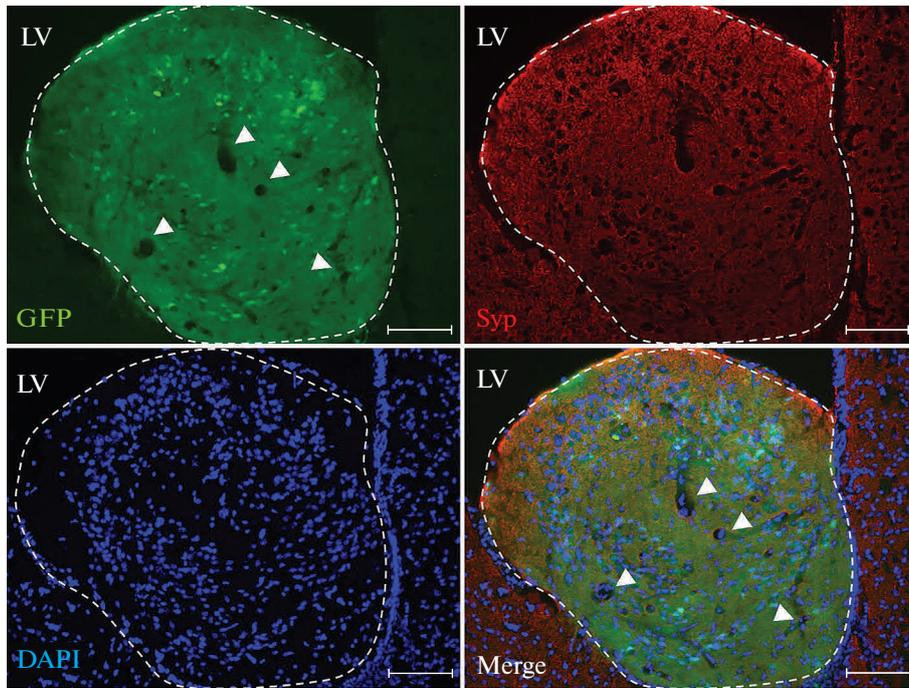


Рис. 7. Трансплантат из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента через 90 сут после операции. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток трансплантата к Synaptophysin (Syp). В ткани четко выражены сосуды (отмечены стрелками). Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

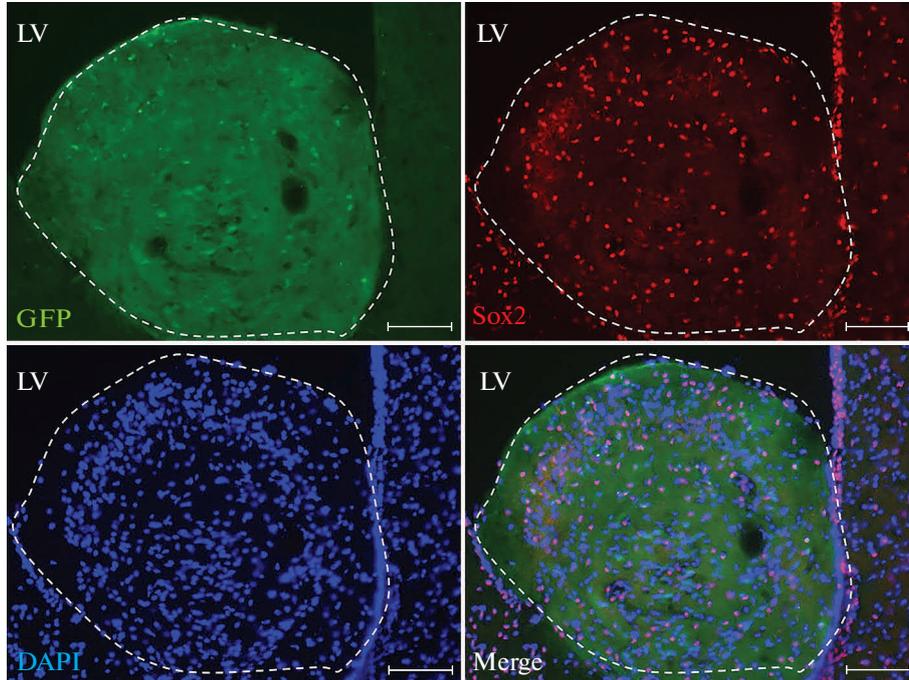


Рис. 8. Структура трансплантата в желудочке мозга реципиента через 90 суток после операции. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток трансплантата к Sox2. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

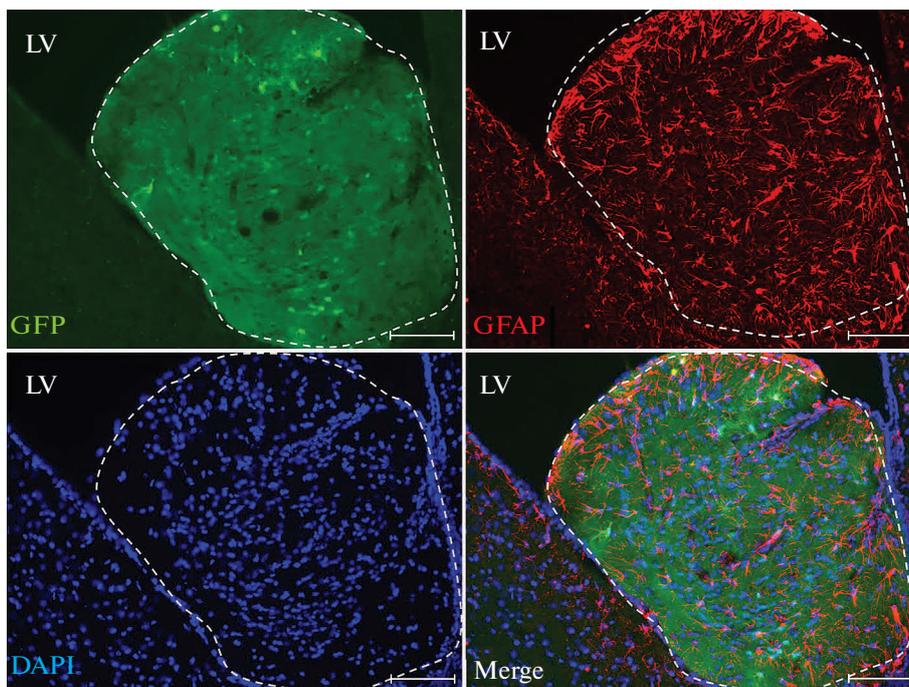


Рис. 9. Трансплантат из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) через 90 сут после операции в желудочке мозга реципиента. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток к маркеру астроцитов GFAP. На границе трансплантата клетки образуют пограничную глиальную мембрану (glia limitans). Между тканями трансплантата и реципиента глиального рубца не образуется. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

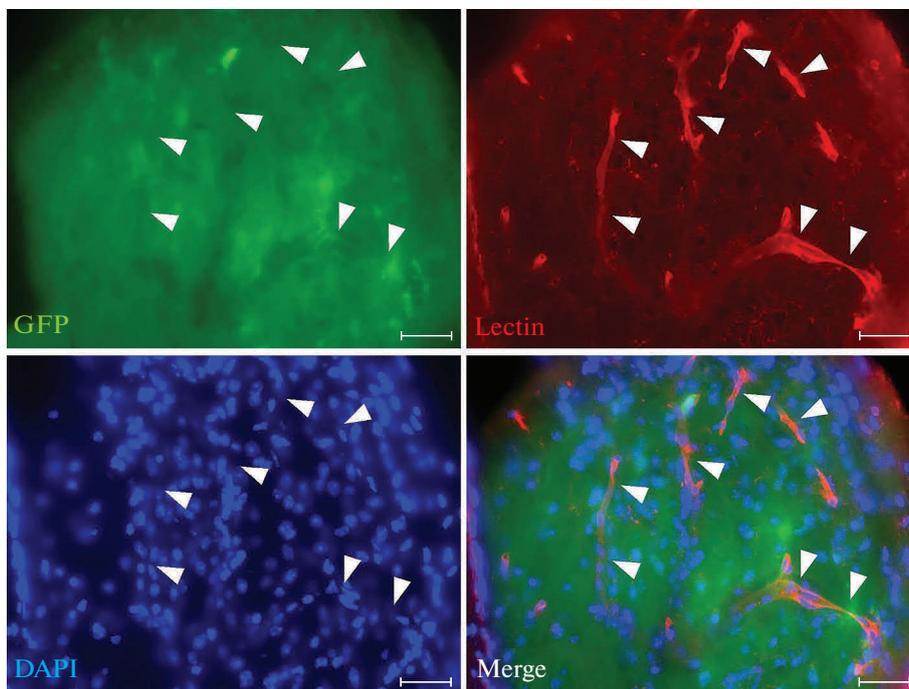


Рис. 10. Трансплантат из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента через 90 сут после операции. Васкуляризация трансплантата, выявленная с помощью лектина с флуоресцентной меткой. Сосуды отмечены стрелками. Масштабный отрезок: 40 мкм.

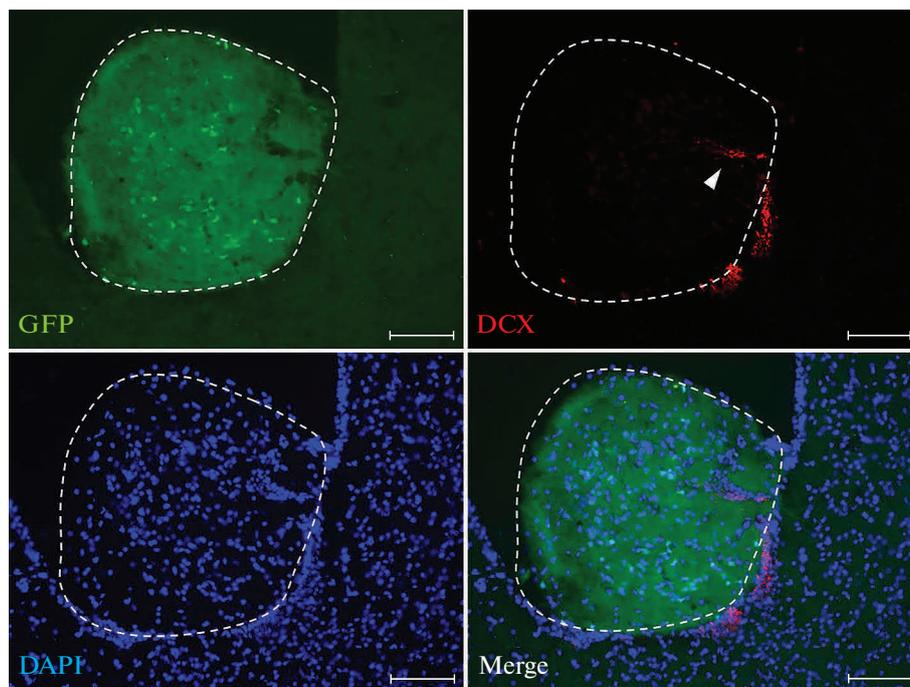


Рис. 11. Трансплантат из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента через 90 сут после операции. Миграция DCX⁺ клеток субвентрикулярной зоны реципиента в трансплантат вдоль растущих сосудов. Трансплантат выделен пунктиром. LV – латеральный желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм.

вые клетки, а требует дальнейшего исследования. В нашем исследовании маркер синаптических визикул синаптофизин был выявлен в трансплан-

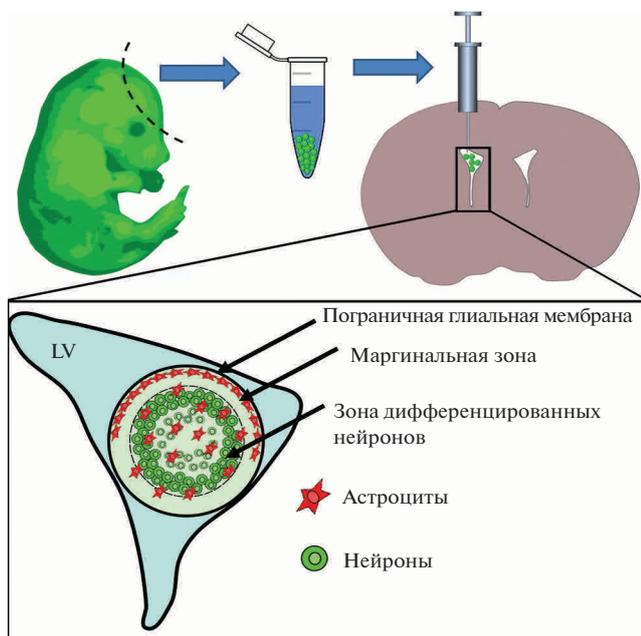


Рис. 12. Самоорганизация суспензированных клеток эмбрионального неокортекса в 3D структуры, напоминающие кортикальные церебральные органоиды, после трансплантации в желудочек мозга. LV – латеральный желудочек.

тате. По данным Pothayee et al. (2018), в подобных трансплантатах наличие зрелых синапсов на клетках выявляется с помощью электронной микроскопии. В дополнение к архитектонической организации 3D церебральных агрегатов, мы также обнаружили их васкуляризацию со стороны мозга реципиента. Мы морфологически выявляли сосуды в 30-суточных трансплантатах, а по данным Потаи (Pothayee et al., 2018) васкуляризация начинается на 6–8 сут. Интересно, что согласно литературным данным, церебральные органоиды, полученные *in vitro* и трансплантированные в паренхиму мозга грызунов также васкуляризируются (Mansour et al., 2018). Проводя сравнение между нашей работой и работами Потаи и Мансур (Pothayee et al., 2018; Mansour et al., 2018) необходимо обратить внимание на различие задач и результатов. Они изучили кооперацию между подсаженными клетками и мозгом реципиента, взаимный рост волокон, миграцию клеток и васкуляризацию. В то время как мы показали возможность самоорганизации суспензированных клеток неокортекса в 3D структуры, напоминающие кортикальные церебральные органоиды (рис. 12). Использование маркеров для специфических нейронов слоев неокортекса позволит в дальнейшем точнее определить их структуру. Кроме того, эту модель можно использовать для изучения развития клеток человека, при условии работы с иммунодефицитными мышами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование церебральных органоидов имеет большое значение для фундаментальной науки и медицины. В настоящей работе представлен альтернативный экспериментальный подход к созданию 3D агрегатов, подобных церебральным органоидам. Использовано культивирование неокортикальных стволовых и малодифференцированных клеток в полостях желудочка мозга экспериментальных животных *in vivo* без специальных питательных сред, которые заменяются спинномозговой жидкостью. Формирование 3D агрегатов с выраженной citoархитектоникой происходит в течение 90 дней. Характерной особенностью этих структур является их высокая степень васкуляризации, которая отличает их от органоидов, созданных *in vitro*. Таким образом, желудочки мозга мыши могут служить инкубатором для развития васкуляризованных трехмерных церебральных структур, напоминающих органоиды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН, а также частично выполнена на оборудовании Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00117).

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

К.К. Сухинич, М.А. Шакирова, Э.Б. Дашинимаев, М.А. Александрова участвовали в разработке эксперимента. К.К. Сухинич и К.М. Шакирова проводили эксперименты. К.К. Сухинич, К.М. Шакирова, М.А. Александрова участвовали в подготовке и написании текста статьи. К.К. Сухинич, М.А. Шакирова, Э.Б. Дашинимаев, М.А. Александрова участвовали в правке текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barati S., Kashani I.R., Moradi F. et al.* Mesenchymal stem cell mediated effects on microglial phenotype in cuprizone-induced demyelination model // *Cell. Bio. Chem.* 2019. V. 120. № 8. P. 13952–13964.
- Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A. et al.* A transcriptome data base for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 1. P. 264–278.
- Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M. et al.* Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals // *Cell. Stem. Cell.* 2008. V. 3. № 5. P. 519–532.
- Eiraku M., Takata N., Ishibashi H. et al.* Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture // 2011. V. 472. № 7341. P. 51–56.
- Englund C., Fink A., Lau C. et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 1. P. 247–251.
- Fan W., Sun Y., Shi Z. et al.* Mouse induced pluripotent stem cells derived Alzheimer's disease cerebral organoid culture and neural differentiation disorders // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 711. № 134433.
- Ferri A.L.M., Cavallaro M., Braidia D. et al.* Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain // *Development.* 2004. V. 131. № 15. P. 3805–3819.
- Freed W.J., Poltorak M., Becker J.B.* Intracerebral adrenal medulla grafts: a review // *Exp. Neurol.* 1990. V. 110. № 2. P. 139–166.
- Gonzalez C., Armijo E., Bravo-Alegria J. et al.* Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry.* 2018. V. 23. № 12. P. 2363–2374.
- Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C. et al.* Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection // *Stem. Cells.* 2010. V. 28. № 9. P. 1568–1570.
- Güven A., Kalebic N., Long K.R. et al.* Extracellular matrix-inducing Sox9 promotes both basal progenitor proliferation and gliogenesis in developing neocortex // *eLife.* 2020. P. 9. e49808.
- Han X., Chen M., Wang F. et al.* Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice // *Cell. Stem. Cell.* 2013. V. 12. № 3. P. 342–353.
- Hori K., Nagai T., Shan W. et al.* Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neuriteogenesis // *Cell. Rep.* 2014. V. 9. № 6. P. 2166–2179.
- Henzi R., Guerra M., Vio K. et al.* Neurospheres from neural stem/neural progenitor cells (NSPCs) of non-hydrocephalic HTx rats produce neurons, astrocytes and multiciliated ependyma: the cerebrospinal fluid of normal and hydrocephalic rats supports such a differentiation // *Cell. Tissue. Res.* 2018. V. 373. № 2. P. 421–438.
- Koo B., Choi B., Park H. et al.* Past, present, and future of brain organoid technology // *Mol. Cells.* 2019. V. 42. № 9. P. 617–627.

- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 373–379.
- Lehtinen M.K., Zappaterra M.W., Chen Xi. et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells // *Neuron*. 2011. V. 69. № 5. P. 893–905.
- Lodato S., Arlotta P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2015. V. 31. P. 699–720.
- Mansour A.A., Gonçalves J.T., Bloyd C.W. et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. № 5. P. 432–441.
- Mariani J., Simonini M.V., Palejev D. et al. Modeling human cortical development *in vitro* using induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 31. P. 12770–12775.
- Pacitti D., Privolizzi R., Bax B.E. Organs to cells and cells to organoids: The evolution of *in vitro* central nervous system modelling // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. Apr. 9. V. 13. № 129.
- Pothayee N., Maric D., Sharer K. et al. Neural precursor cells form integrated brain-like tissue when implanted into rat cerebrospinal fluid // *Commun. Biol.* 2018. V. 1. № 114.
- Qian X., Song H., Ming G.L. Brain organoids: advances, applications and challenges // *Development*. 2019. V. 146. № 8. pii: dev166074.
- Rahimi J., Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology // *Handb. Clin. Neurol.* 2017. V. 145. P. 563–571.
- Sukhinich K.K., Aleksandrova M.A. Cerebral organoids: A model of brain development // *Russian J. Developmental Biology*. 2020. V. 51. P. 231–245.
- Todd G.K., Boosalis C.A., Burzycki A.A. et al. Towards neuronal organoids: a method for long-term culturing of high density hippocampal neurons // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. e58996.
- Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A. et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 3. P. 288–296.
- Zheng T., Marshall G.P. 2nd, Laywell E.D., Steindler D.A. Neurogenic astrocytes transplanted into the adult mouse lateral ventricle contribute to olfactory neurogenesis, and reveal a novel intrinsic subependymal neuron // *Neuroscience*. 2006. V. 142. № 1. P. 175–185.

Development of 3D Cerebral Aggregates in the Brain Ventricles of Adult Mice

K. K. Sukhinich^{1,*}, K. M. Shakirova², E. B. Dashinimaev^{1,2}, and M. A. Aleksandrova¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: sukhinichkirill@gmail.com

The cerebral organoids are three-dimensional cell cultures formed from brain-specific cell types arising from embryonic or pluripotent stem cells. Organoids provide an opportunity to study the early stages of brain development and diseases of the central nervous system. However, the modeling of organoids is associated with a number of unsolved problems. Organoid production techniques involve a complex cell culture process that requires special media, growth factors, and often the use of a bioreactor. Even under standardized conditions, structures of different morphology are formed: from disorganized cell aggregates to structured mini-brains, which are selected for study. For natural reasons, organoids grown *in vitro* do not have a blood supply, which limits their development. We tried to obtain cerebral aggregates similar to organoids in an *in vivo* model, where vascular growth and tissue blood supply are provided, for which we transplanted a cell suspension from the mouse embryonic neocortex into the lateral ventricles of the brain of adult mice. Therefore, the medium for cultivation was the cerebrospinal fluid, and the lateral ventricles of the brain, where it circulates, served as a bioreactor. The results showed that the neocortex from E14.5 is a suitable source of stem/progenitor cells that self-assemble into three-dimensional aggregates and vascularized *in vivo*. The aggregates consisted of a central layer of mature neurons, the marginal zone free of cells and a glia limitans, which resembled cerebral organoids. Thus, the lateral ventricles of the adult mouse brain can be used to obtain vascularized cell aggregates resembling cerebral organoids.

Keywords: cerebral organoids, neocortex, transplantation, GFP, immunohistochemistry, RT-PCR

**ИЗМЕНЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОГЛИОЦИТОВ
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СПИННОГО МОЗГА СВИДЕТЕЛЬСТВУЮТ
ОБ УЧАСТИИ МИКРОГЛИИ В РЕГУЛЯЦИИ
НЕЙРОГЕНЕЗА И СИНАПТОГЕНЕЗА**

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

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

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.12.2020 г.

После доработки 24.01.2021 г.

Принята к публикации 27.01.2021 г.

Изучены локализация и распределение микроглиоцитов в эмбриональном спинном мозге (СМ) крысы в период формирования предшественников двигательных нейронов. Для идентификации клеток микроглии применяли антитела к белку Iba-1. Для исследования динамики развития клеток эмбрионального СМ использовали следующие иммуногистохимические маркеры: виментин (маркер клеток радиальной глии), даблкортин (маркер нейробластов) и синаптофизин (маркер синаптических везикул). Показано, что предшественники микроглии проникают в дорзальную часть спинного мозга на 12 сут эмбрионального развития, а в области формирующихся мотонейронов обнаруживаются на 14-е сутки. Установлено, что эмбриональные микроглиоциты находятся в тесных взаимоотношениях с отростками радиальной глии и отростками нейробластов передних рогов. Исследование динамики развития эмбрионального СМ крысы и сопоставление процессов его гистогенеза с локализацией и морфологическими изменениями эмбриональной микроглии указывает на ее участие в синаптогенезе и в дифференцировке мотонейронов (нейрогенезе).

Ключевые слова: спинной мозг крысы, эмбриогенез, микроглиоциты, белок Iba-1, даблкортин, синаптофизин, виментин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0475145021030046

ВВЕДЕНИЕ

Микроглиоциты являются автономной самообновляющейся популяцией фагоцитирующих клеток ЦНС, осуществляющих непрерывный контроль внеклеточной среды как при физиологических, так и при патологических состояниях. Согласно современным представлениям, микроглиоциты происходят из эритромиелоидных клеток-предшественников желточного мешка, проникающих в ЦНС на ранних этапах пренатального развития и способных сохраняться в постнатальном периоде. После формирования гематоэнцефалического барьера, популяция микроглии поддерживается путем пролиферации (Tseng et al., 1982; Ginhoux et al., 2010; Коржевский и др., 2012). Большинство исследований, посвященных происхождению микроглиоцитов было выполнено на мышах и рыбах данио. Значительно меньше информации о ранней колонизации клетками микроглии нервной системы крыс (Tseng et al., 1982; Wang et al., 1996). Показано, что в физиологических условиях микроглиа присутствует в ЦНС в неактив-

рованной (разветвленной) форме. Разветвленные микроглиальные клетки способны реагировать на возникающие изменения гомеостаза ЦНС, вступая в процесс активации, что сопровождается разнообразными морфофункциональными изменениями. Известно, что микроглиа зрелой ЦНС осуществляет защиту от повреждающих агентов путем фагоцитоза, презентации антигенов и секреции про- и противовоспалительных цитокинов; осуществляет реорганизацию нейронных цепей путем непосредственного взаимодействия с синапсами, их элиминации и модулирования активности нейронов; выполняет нейропротекторную функцию, стимулирует рост аксонов, способствует выживанию и дифференцировке предшественников олигодендроцитов (Tremblay et al., 2010; Tay et al., 2017; Li et al., 2020). В многочисленных исследованиях изучается участие этих клеток в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и др.), их реакция на инфекционные поражения нервной системы и травмы головного и спинного

мозга (Колос, Коржевский, 2020). Большое внимание в научной литературе уделяется микроглиальным клеткам как регуляторам развития головного мозга в норме и при повреждающих воздействиях в пренатальном и раннем постнатальном периодах (Pont-Lezica et al., 2011, 2014; Michell-Robinson et al., 2015; Lenz, Nelson, 2018; Sufieva et al., 2020). Развитие микроглии, как первого представителя глиальных клеток в нервной трубке, происходит в непосредственной близости от дифференцирующихся нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Астроциты и олигодендроциты появляются в развивающемся спинном мозге (СМ) на более поздних стадиях пренатального развития (Chaboub, Deneen, 2012; Tien et al., 2012; Chen et al., 2017). Это свидетельствует о важной роли микроглиоцитов при развитии нервной системы. До сих пор остается много неизученных вопросов, касающихся участия микроглии в процессах гистогенеза СМ и в поддержании его гомеостаза. Функции, выполняемые предшественниками микроглиоцитов на разных этапах пренатального развития, а также особенности заселения развивающегося СМ микроглиальными клетками остаются неясными. Исследования, касающиеся изучения микроглии в эмбриональном спинном мозге млекопитающих, немногочисленны и выполнены на эмбрионах мышей и птиц (Caldero et al., 2009; Rigato et al., 2011).

Цель настоящего исследования состояла в изучении распределения микроглиальных клеток в спинном мозге крысы в период эмбрионального и раннего постнатального развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании изучен формирующийся СМ крыс, начиная с 11 сут эмбрионального развития, то есть с момента закрытия нервной трубки (Altman, Bayer, 2001), до рождения. Работа выполнена на эмбрионах крыс Вистар 11–19 сут развития (E11–E19, $n = 30$) и новорожденных крысах (P1, $n = 3$). Работа с животными проводилась в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019). У эмбрионов и новорожденных крыс выделяли фрагменты СМ в области шейного отдела на уровне 3–5 сегмента. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Kogzevskii et al., 2015) в течение суток, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле, заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. Для выявления клеток микроглии применяли поликлональные козы

антитела к кальций-связывающему белку Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) (разведение 1 : 200, AbCam, Великобритания). Белок Iba-1 является маркером микроглиоцитов нервной системы и других фагоцитирующих клеток и позволяет идентифицировать эти клетки как во взрослом организме (Колос, Коржевский, 2020; Streit et al., 2014; Kongsui et al., 2014), так и в эмбриогенезе (Rigato et al., 2011; Ueno et al., 2013; Marsters et al., 2020). Перед проведением иммуногистохимической реакции на Iba-1 производили тепловое демаскирование антигена. Блокировку эндогенной пероксидазы и неспецифических сайтов связывания антигена, а также выявление связавшихся первичных антител проводили с использованием реагентов из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit (кат. № S008, R&D Systems, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю. Для маркирования формирующихся синаптических контактов в ventральной части СМ эмбрионов крыс и новорожденных животных проводили иммуногистохимическое выявление синаптофизина – гликопротеина мелких пресинаптических пузырьков нервных клеток (Колос и др., 2015) с применением кроличьих поликлональных первичных антител (MON-RTU1195, Monosan, Нидерланды). В качестве вторичных антител применяли реагенты из набора Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (SpringBioscience, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США). Полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), изображения получали с применением фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия).

Для флуоресцентной микроскопии с целью выявления Iba1-содержащих клеток в качестве вторичных реагентов применяли биотинилированные антитела против иммуноглобулинов козы из набора R&D Systems (CTS008, R&D Systems, США), а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (#016-220-084, Jackson ImmunoResearch, США). Для идентификации радиальной глии в формирующемся СМ эмбрионов крыс применяли моноклональные антитела к виментину (Клон V-9, M0725, Agilent, США) и вторичные антитела, конъюгированные с тетраметилроданинзотиоцианатом (TRITC) (Agilent, США). Нейриты дифференцирующихся нейронов передних рогов СМ эмбрионов крыс выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител к даблкортину (DCX) (ab18723, Abcam, Великобри-

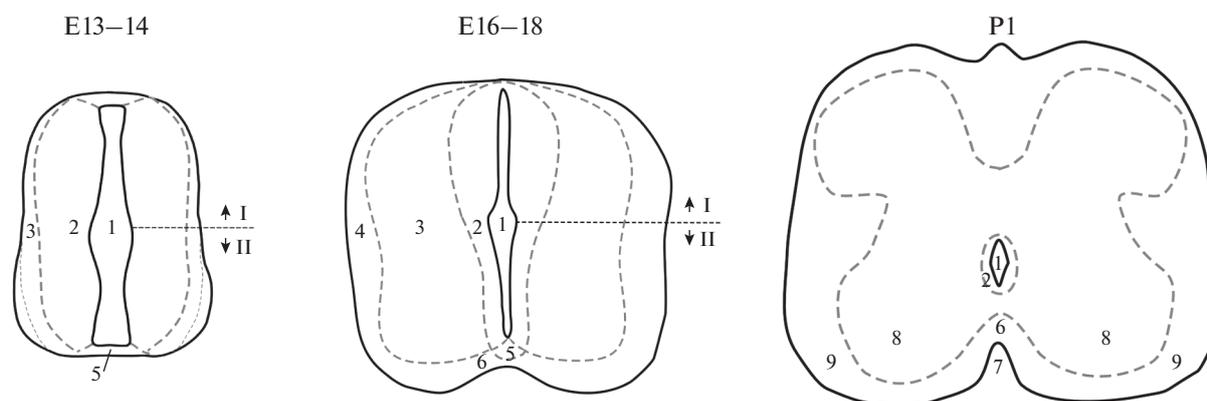


Рис. 1. Схемы поперечных срезов шейного отдела СМ крыс на E13–14, E16–18 и P1. I – алярная пластинка; II – базальная пластинка; 1 – формирующийся центральный канал; 2 – эпендимный слой; 3 – мантийный слой; 4 – маргинальный слой; 5 – донная пластинка; 6 – передняя белая спайка; 7 – передняя срединная щель; 8 – серое вещество передних рогов СМ; 9 – белое вещество передних рогов СМ.

тания, разведение 1 : 500) и вторичных антител, конъюгированных с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC) (Agilent, США). Препараты анализировали с применением конфокального лазерного микроскопа LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 применяли лазер 488 нм, для TRITC – 561 нм. Анализ изображений проводили с использованием программы ZEN 2012 (Zeiss, Германия).

С целью оценки специфичности взаимодействия антител с тканевыми антигенами и для выявления возможного неспецифического окрашивания для каждой иммуногистохимической реакции проводили отрицательный и положительный контроль. Вместо первичных антител на срезы наносили разбавитель для антител (S0809) (Dako, Дания). В качестве положительного контроля были использованы микроглиоциты на срезах СМ взрослых животных.

Для оценки изменений количества микроглиоцитов в изучаемой области производили подсчет числа Iba-1-иммунопозитивных клеток, содержащих ядро в плоскости среза, на единицу площади (1 мм^2) базальной пластинки спинного мозга эмбрионов и вентральной части СМ новорожденных крыс.

Измерение площади изучаемой области осуществляли с использованием программы ImageJ (NIH, США). Данные гистограммы приведены как среднее значение в группе со стандартной ошибкой. Статистический анализ различий между группами проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (непараметрический дисперсионный анализ) с последующим проведением попарных сравнений с помощью критерия Манна–Уитни при $p < 0.05$.

Структурные особенности Iba-1-содержащих клеток определяли с учетом их топографии в пре-

делах вентральной части (эпендимный, мантийный и маргинальный слои базальной пластинки) формирующегося спинного мозга крыс. На рис. 1 приведены схемы поперечных срезов СМ крыс на разных сроках развития с указанием зон, названия которых используются авторами настоящего исследования для обозначения локализации Iba-1-иммунопозитивных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На поперечных гистологических срезах эмбрионального СМ отмечено несколько зон концентрации Iba-1-иммунопозитивных клеток в разных его частях. В настоящей работе основное внимание уделяли вентральной части формирующегося СМ, поскольку именно здесь закладываются основные нейроны, обеспечивающие двигательные функции.

Установлено, что на E11 в нервной трубке, которая представлена псевдомногослойным нейроэпителием, Iba-1-иммунопозитивные (Iba1+) клетки отсутствуют. На следующие сутки развития (E12) единичные иммунопозитивные клетки начинают проникать в формирующийся спинной мозг крысы, преимущественно в дорзальной части.

Начиная с E13, в вентральной части развивающегося СМ эмбрионов крыс можно идентифицировать слой округлых нейробластов в зоне дифференцирующихся клеток, дающих начало серому веществу передних рогов СМ. Среди них присутствуют единичные клетки, ориентированные медиолатерально и имеющие отросток, направленный к наружной поверхности СМ, в последствии формирующие передний корешок СМ. На этом сроке нами не было отмечено присутствие Iba-1-иммунопозитивных клеток среди нейробластов развивающихся передних рогов. Крайне редко были отмечены единичные Iba1+ клетки в эпендимной зоне.

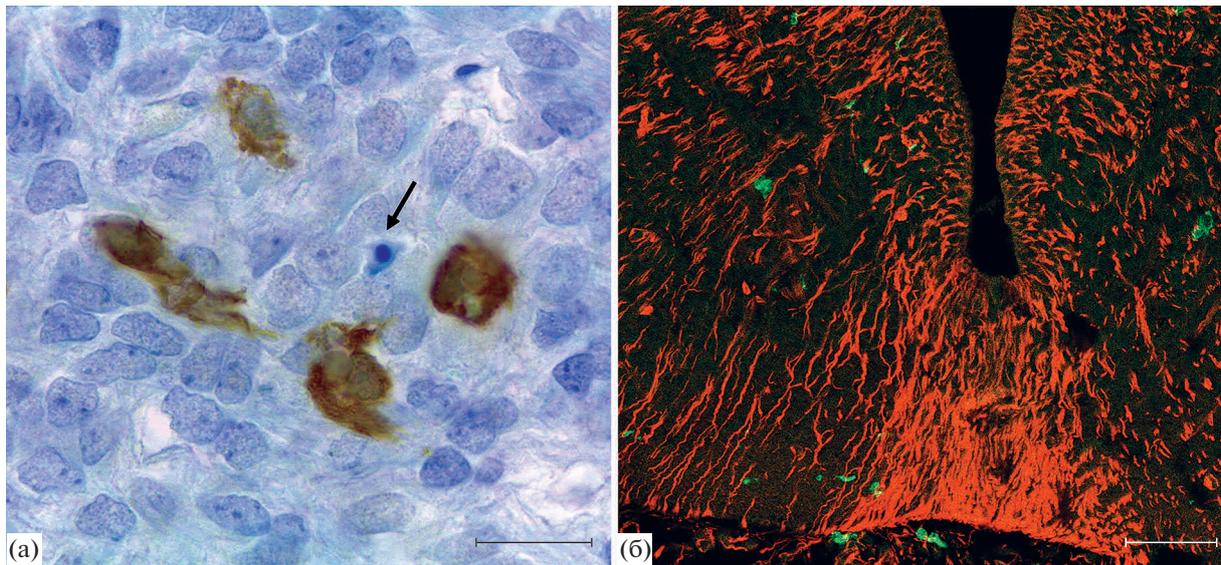


Рис. 2. Iba-1-иммунопозитивные клетки формирующегося спинного мозга эмбриона крысы на 15 сутки развития. Стрелка — апоптотное тельце. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1, докраска толуидиновым синим (а); иммунофлуоресцентная реакция на белок Iba-1 (Cy2 — зеленое окрашивание) и виментин (TRITC — красное окрашивание); конфокальная лазерная микроскопия (б). Масштаб 20 мкм (а), 50 мкм (б).

На E14 в СМ эмбрионов крыс идентифицируются три concentрических слоя: эпендимный, мантийный и маргинальный. Мантийный слой базальной пластинки в вентро-латеральной части представлен округлыми клетками, некоторые из которых имеют длинные отростки, проходящие к периферии развивающегося СМ и формирующие презумптивные передние корешки СМ. Также в этой зоне идентифицируются дорзо-вентрально ориентированные комиссуральные вставочные нейробласты. Iba1⁺ клетки в вентральной части мантийного слоя немногочисленны, чаще располагаются на границе между мантийным и маргинальным слоями. Такие иммунопозитивные клетки имеют веретеновидное или округлое тело с одним или двумя отростками. Единичные амебоидные клетки присутствуют в области формирующихся мотонейронов.

На 15 сут в мантийном слое базальной пластинки идентифицируются дорзо-вентрально ориентированные комиссуральные нейробласты, кластеры молодых мотонейронов и окружающие их вставочные нейробласты. Клетки донной пластинки имеют отростки, которые достигают базальной мембраны СМ и в последствии формируют вентральную срединную щель. В мантийном слое базальной пластинки на E15 выявлены крупные амебоидные Iba1⁺ клетки нередко образующие группы (рис. 2а; рис. 5б). Кроме того, на этом сроке также были отмечены амебоидные иммунопозитивные клетки в области, прилежащей к формирующейся передней белой спайке: небольшие скопления Iba1⁺ клеток локализуются меж-

ду донной пластинкой и мантийной зоной базальной пластинки. Отдельные амебоидные Iba-1⁺ клетки этой зоны ориентированы горизонтально, они повторяют направление аксонов, формирующих переднюю белую спайку. Среди отростков клеток донной пластинки, образующих срединную борозду СМ, иммунопозитивных клеток не обнаружено. В маргинальном слое базальной пластинки идентифицируются иммунопозитивные клетки веретеновидной и амебоидной формы без отростков. Такие клетки часто ориентированы вдоль волокон маргинального слоя.

Отдельные Iba-1-иммунопозитивные клетки прилежат к Vim-содержащим отросткам радиальной глии. Также выявлены единичные амебоидные клетки, ориентированные медиолатерально на границе маргинальной и мантийной зоны базальной пластинки, перпендикулярно по отношению к виментин-содержащим отросткам (рис. 2б).

В вентральной части спинного мозга эмбрионов крыс E16–17 определяются области формирования интернейронов и изолированные формирующиеся двигательные ядра. На E16–17 в мантийной зоне базальной пластинки (формирующееся серое вещество передних рогов СМ) амебоидные иммунопозитивные клетки преобладают в области формирующихся двигательных ядер СМ. Однако отдельные Iba1⁺ клетки с амебоидной морфологией присутствуют и среди развивающихся интернейронов. На этом сроке также были выявлены единичные амебоидные иммунопозитивные клетки в области формирующейся передней белой спайки.

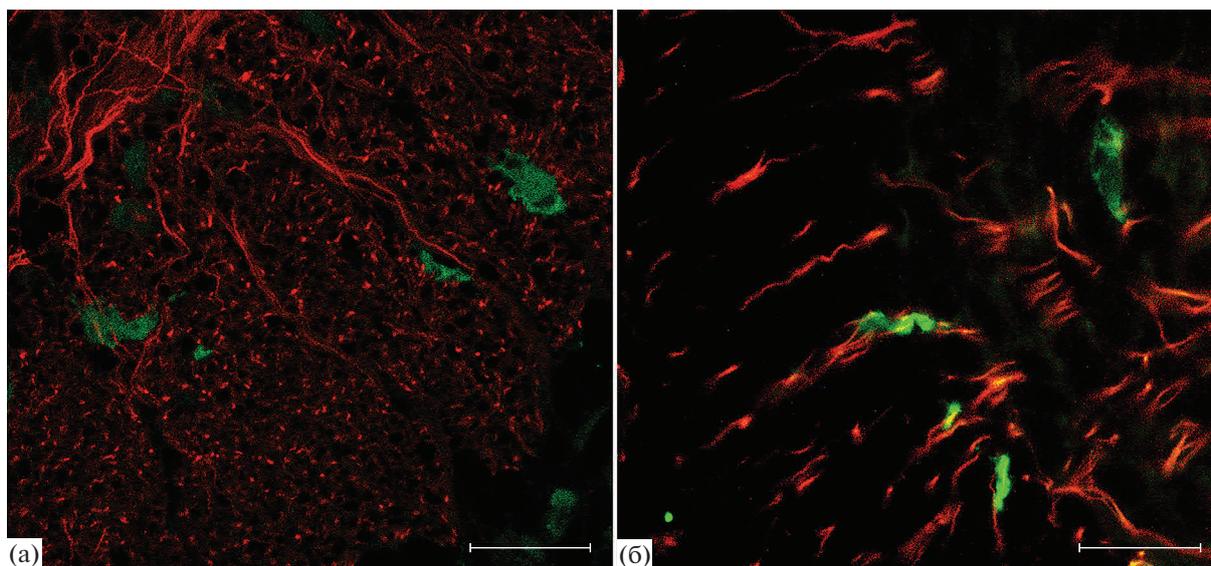


Рис. 3. Iba-1-иммунопозитивные клетки вблизи отростков молодых нейронов (а) и отростков радиальной глии (б) в СМ крысы на 16 сут эмбрионального развития. Двойная иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 (Cy2 – зеленое окрашивание) и даблкортин (TRITC – красное окрашивание) (а); двойная иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 (Cy2 – зеленое окрашивание) и виментин (TRITC – красное окрашивание) (б). Конфокальная лазерная микроскопия. Масштаб 20 мкм.

Также в этот период развития в маргинальном слое базальной пластинки идентифицированы Iba1-содержащие амeboидные клетки, находящиеся в непосредственной близости к DCX-иммунопозитивным волокнам и, вероятно, взаимодействующие с ними (рис. 3а), а также Iba-1-иммунопозитивные клетки веретеновидной формы, ориентированные вдоль Vim-иммунопозитивных отростков радиальной глии (рис. 3б). Отдельные Iba-1+ клетки окружают Vim-содержащие структуры, расположенные непосредственно под оболочками СМ – субпиальные ножки радиальной глии.

Спинной мозг эмбрионов 18 сут развития имеет ряд отличий по сравнению с предыдущими сроками. Редуцируется эпендимный слой, презумптивный центральный канал становится уже, в мантийном слое можно видеть области формирования дорзальных и вентральных рогов, расширился маргинальный слой, вентральная и дорзальная срединные борозды становятся более заметными.

На E18 в формирующемся сером веществе передних рогов СМ иммунопозитивные клетки распределены достаточно равномерно как в области формирующихся двигательных ядер, так и среди молодых интернейронов. Отдельные Iba1-содержащие клетки имеют округлое тело и несколько тонких разветвленных отростков (рис. 4а). Однако большая часть Iba1-содержащих клеток имеет неправильную форму с утолщенными маловетвистыми отростками.

Иммунопозитивные клетки в области формирующейся передней белой спайки на E18 имеют морфологические признаки рамифицированных микроглиоцитов. Их тонкие длинные отростки нередко ориентированы вдоль волокон, расположенных под донной пластинкой и формирующих белую спайку и вдоль отростков клеток донной пластинки, формирующих срединную борозду (рис. 4б).

Через сутки (E19) эпендимный слой СМ крысы уменьшается, центральный канал сужается, расширяется область формирующегося серого вещества и белого вещества СМ, вентральная и дорзальная борозды, которые делят белое вещество углубляются. На E19 в формирующемся сером веществе передних рогов СМ гипертрофированные (рис. 5г) и амeboидные микроглиоциты выявлены преимущественно среди молодых интернейронов, редкие из них присутствуют в области формирующихся двигательных ядер. В формирующемся белом веществе передних рогов СМ также выявлены Iba1-иммунопозитивные клетки. Это мелкие клетки неправильной формы или веретеновидные клетки, ориентированные вдоль волокон, проходящих через белое вещество.

Спинной мозг новорожденной крысы отличается от эмбрионального увеличенными размерами белого и серого вещества. В первые сутки после рождения (P1) в спинном мозге крыс присутствует большое количество Iba-содержащих клеток. В сером веществе вентральных рогов СМ, иммунопозитивные клетки распределены равномерно и име-

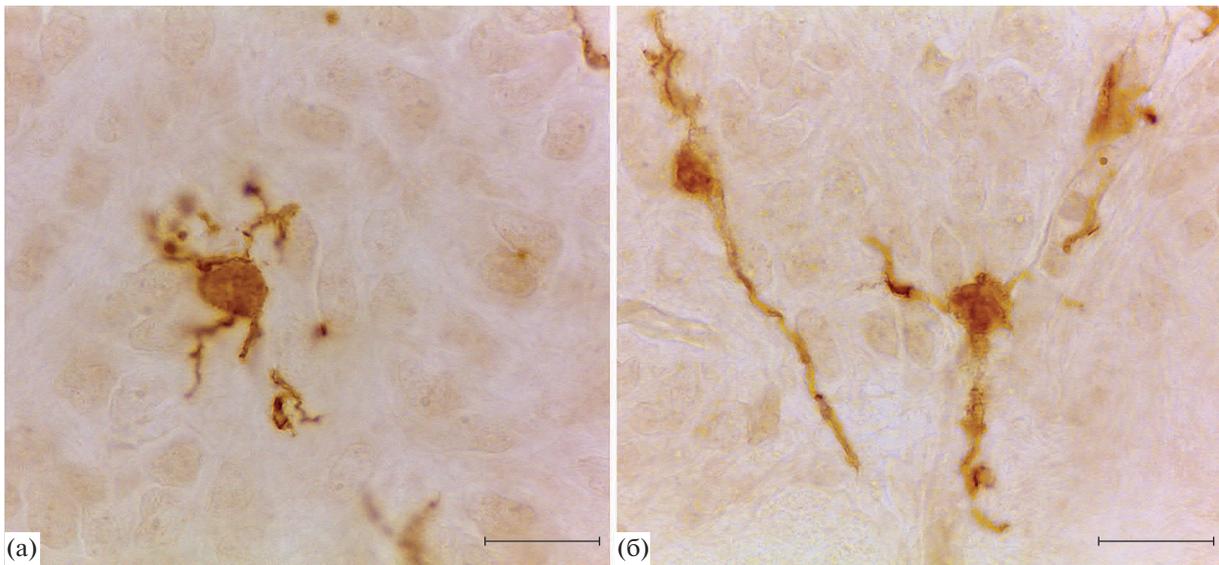


Рис. 4. Iba-1-иммунопозитивные клетки формирующегося серого вещества передних рогов спинного мозга крысы (а) и зоны формирующейся передней белой спайки (б) на 18 сутки эмбрионального развития. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Масштаб 20 мкм.

ют неправильную форму с утолщенными маловетвящимися отростками (рис. 5е) или имеющие толстые короткие отростки (гипертрофированные и кустистые микроглиоциты). Единичные клетки имеют длинные тонкие разветвленные отростки. Иммунопозитивные клетки передней белой спайки имеют округлые тела и ветвящиеся отростки, ориентированные вдоль аксонов комиссуральных нейронов или нервных волокон, образующих срединную борозду. Однако микроглиоциты этой зоны по морфологическим признакам отличаются от рамифицированной микроглии взрослых животных, среди них преобладают гипертрофированные клетки.

С применением метода иммуногистохимического выявления синаптофизина было показано, что начиная с 15 сут эмбрионального развития в формирующихся передних рогах СМ крыс идентифицируются иммунопозитивные отростки нейробластов (рис. 5а). К 19 суткам развития иммунореактивность проявляют синаптоподобные округлые структуры, расположенные на поверхности нейробластов и их отростков (рис. 5в). В передних рогах спинного мозга новорожденных крыс реакция на синаптофизин позволила выявить большое количество синаптических бутонов вокруг тел нейронов и их отростков (рис. 5д).

При проведении отрицательного контроля для иммуногистохимической реакции для всех используемых в исследовании антител на препаратах окрашивания выявлено не было. При проведении положительного контроля иммунореактивность отмечена в микроглиоцитах СМ. Неспе-

цифического окрашивания и автофлуоресценции не наблюдалось.

Количественный анализ показал, что с момента входа первых микроглиоцитов в вентральную часть СМ (Е14) до рождения плотность распределения клеток микроглии увеличивается более чем в 5 раз ($p < 0.05$) (рис. 6). Установлено, что наибольшее изменение количества клеток наблюдается в ранний период эмбриогенеза — между Е14 и Е15. Число микроглиоцитов на единицу площади базальной пластинки СМ в этот период возрастает в три раза ($p < 0.05$) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы многочисленные исследования доказывают значимую роль клеток микроглии в развитии ЦНС (Ueno et al., 2013; Pont-Lezica et al., 2014; Reemst et al., 2016). Однако распределение микроглиоцитов в развивающемся СМ и их функциональное значение на разных этапах эмбриогенеза не ясно до сих пор. Проведенное в настоящей работе сопоставление процессов, происходящих в развивающемся СМ, с распределением и локализацией микроглиоцитов позволило предположить участие этих клеток, как первых активно функционирующих глиоцитов, в пренатальном нейро- и глиогенезе.

Показано, что в эмбриональном СМ микроглиальные клетки, не обладают длинными отростками, а имеют амебоидную, кустистую или гипертрофированную форму вплоть до позднего пренатального и раннего постнатального периода. То есть, по морфологическим признакам эмбриональная

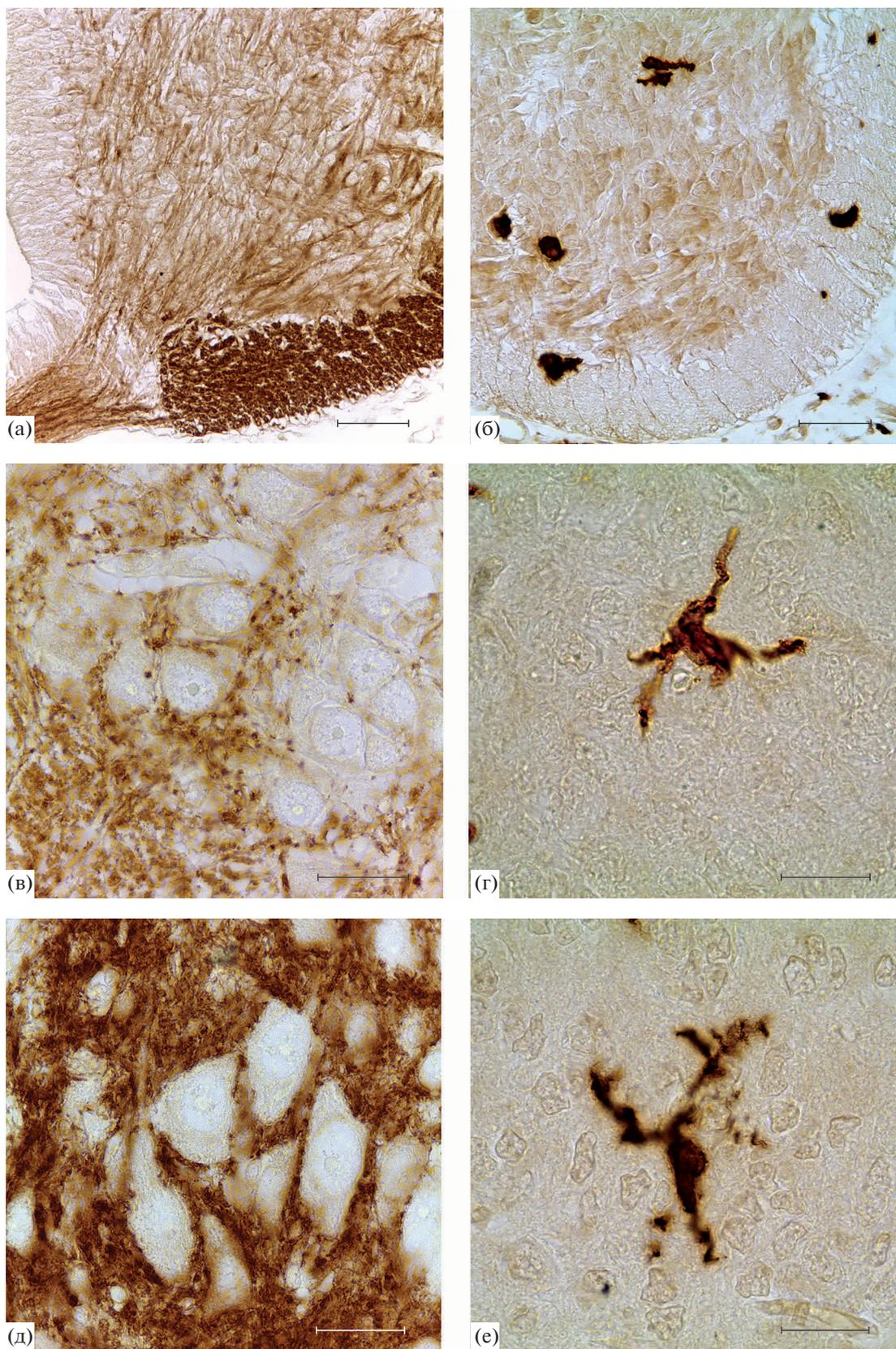


Рис. 5. Синаптофизин-иммунопозитивные структуры и микроглиозиты в спинном мозге крыс на 15 сут (а, б), 19 сут (в, г) эмбрионального развития и после рождения (д, е). Иммуногистохимические реакции на синаптофизин (а, в, д) и белок Iba-1 (б, г, е). Масштаб 50 мкм (а, б); 20 мкм (в, г, д, е).

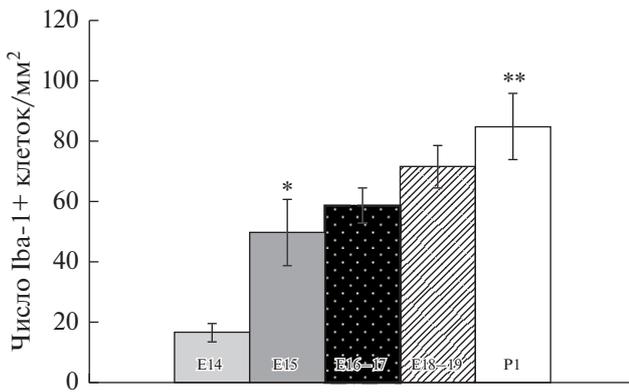


Рис. 6. Динамика изменения количества Iba-1-иммунопозитивных клеток в вентральной области СМ крыс на разных сроках развития. * — $p^{E14 \text{ и } E15} < 0.05$; ** — $p^{E14 \text{ и } P1} < 0.05$; $p^{E15 \text{ и } E16-17}$; $p^{E16-17 \text{ и } E18-19}$; $p^{E18-19 \text{ и } P1} > 0.1$.

микроглия близка к активированному типу микроглиоцитов взрослого спинного мозга (Колос, Коржевский, 2020). Однако недавние исследования демонстрируют, что развивающаяся микроглия не вступает в классический процесс активации, в противоположность микроглии взрослых животных, которая активируется в ответ на воспаление или нейродегенерацию. Эмбриональная микроглия фенотипически значительно отличается от активированной микроглии взрослых животных (Bennett et al., 2016). Также ряд исследований демонстрирует более высокую скорость миграции эмбриональных микроглиоцитов по сравнению с активированными клетками взрослой ЦНС (Stence et al., 2001; Swinnen et al., 2013). Вероятно, форма клеток, лишенных длинных разветвленных отростков, позволяет поддерживать высокую мобильность микроглиоцитов и обеспечивать миграцию и колонизацию различных областей развивающегося СМ. Таким образом, эмбриональная микроглия обладает уникальными свойствами, отличающими ее от “активированных” и “покоящихся” микроглиоцитов ЦНС взрослых животных.

Нами отмечено, что на поздних сроках эмбриогенеза и в раннем постнатальном периоде, наряду с гипертрофированным, кустистым и амебодными клетками микроглии, в передних рогах СМ крыс появляются первые клетки с длинными тонкими ветвящимися отростками (после E18). Можно предположить, что такие морфологические изменения связаны с переходом клеток от высокой мобильности к стационарному состоянию с преобладанием контролирующих функций с целью выявления отклонений гомеостаза, контроля функционирования нейронных сетей и синаптического ремоделирования.

Настоящее исследование эмбриональной микроглии на разных сроках формирования спинного мозга показало, что ее локализация изменяется в разные периоды развития. Динамика распределения микроглиальных клеток может быть связана с гистогенетическими процессами, происходящими в развивающемся СМ, такими как пролиферация, программируемая клеточная гибель, миграция и дифференцировка, синаптогенез, развитие и реорганизация нейронных цепей.

Микроглиоциты являются резидентными макрофагами ЦНС и способны к фагоцитозу. Возможно, одна из их функций в эмбриогенезе связана с апоптозом нейробластов. В ходе настоящего исследования в базальной пластинке эмбрионального СМ были обнаружены единичные апоптотные тельца. Основываясь на литературных данных можно предположить, что идентифицированная нами амебодная микроглия, присутствующая в области формирующихся мотонейронов, начиная с E15 может принимать активное участие в их программируемой клеточной гибели, происходящей в вентральной части эмбрионального СМ в этот период.

Нами отмечено, что проникновение ранней микроглии в мантийный слой базальной пластинки (будущее серое вещество передних рогов СМ) совпадает с важной стадией развития СМ, во время которой нейронные сети становятся функциональными и начинается синаптогенез. По литературным данным известно, что синаптогенез в вентральной части СМ крыс начинается с E13.5 (Vaughan, Grieshaber, 1973; Prasad et al., 2008). Согласно данным авторов, на E13.5 и E14.5 в вентральной части СМ крысы идентифицируются единичные аксосоматические синаптические контакты, содержащие немногочисленные синаптические пузырьки (по 3–4 в бутоне). Позднее, в период появления первых рефлексов (E 15.5 и 16.5) количество бутонов увеличивается, число синаптических пузырьков в зоне пресинаптической мембраны также возрастает (Vaughan, Grieshaber, 1973). Пик синаптогенеза в СМ наблюдается в период E16–17 (May, Viscoe, 1975). По нашим данным синаптофизин, являющийся белком синаптических везикул (Колос и др., 2015), начиная с E15, идентифицируется в отростках развивающихся двигательных, вставочных и комиссуральных нейронов, что свидетельствует о начале его активной транспортировки от тела нервных клеток к незрелым синаптическим контактам в области передних рогов СМ. Синаптофизин участвует в регуляции функционирования синапсов, включая такие процессы как экзоцитоз, биогенез и эндоцитоз везикул (Kwon, Charman, 2011). Синаптофизин-содержащие синаптоподобные округлые структуры вблизи тел молодых нейронов и их отростков идентифицированы нами, начиная с

E19, в период активного функционирования нейронных цепей.

В настоящем исследовании Iba-1-иммунопозитивные клетки в области формирующихся передних рогов впервые обнаружены, начиная с E14, в период начала образования первых незрелых синаптических контактов в вентральной части формирующегося СМ. Во время наиболее активного синаптогенеза (E16–17) популяция микроглиоцитов в этой области увеличивается. Это может быть связано с участием эмбриональных микроглиоцитов в процессе образования, устраниения избыточных и ремоделирования синаптических контактов.

После рождения в СМ крыс продолжается активный синаптогенез и развитие нейронных сетей. В передних рогах СМ новорожденных животных идентифицируется большое количество округлых синаптофизин-иммунопозитивных синаптических бутонов на телах и отростках нейронов. По нашим данным в этот период в вентральной части СМ популяция микроглиоцитов достаточно многочисленна, что связано с активным синаптогенезом, происходящим в этой области. Как известно, в развивающейся ЦНС нейронная сеть не обладает точностью и структурированностью, характерной для зрелой нервной системы (Hua, Smith, 2004). Количество образовавшихся синапсов избыточно. В процессе синаптического прунинга большое количество контактов удаляются, оставшиеся же поддерживаются, созревают и контролируются. Считается, что основными клетками-модуляторами синаптической обрезки в процессе развития ЦНС являются микроглиоциты (Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010; Schaffer et al., 2012). Имея достаточную степень ветвления отростков, микроглия в постнатальном периоде способствует созреванию синаптических контактов (Mosser et al., 2017), контролирует их функциональное состояние и потенциально способствует устранению нефункциональных соединений (Wake et al., 2009; Kim et al., 2017; Filipello et al., 2018).

В настоящем исследовании было отмечено увеличение количества Iba1-иммунопозитивных клеток в маргинальном слое базальной пластинки СМ, начиная с 15 сут эмбрионального развития крыс. С применением метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания установлено, что микроглиоциты этой области СМ располагаются в непосредственной близости от DCX-содержащих аксонов молодых мотонейронов, проходящих через белое вещество передних рогов и формирующих презумптивные передние корешки СМ. Такое взаимодействие может свидетельствовать о влиянии эмбриональных микроглиоцитов на рост нейритов. Существуют косвенные доказательства того, что микроглиоциты способ-

ны оказывать влияние на рост аксонов (блокировать или стимулировать) и изменять направление их роста. Предполагается, что в развивающейся ЦНС, особенно в белом веществе, они способствуют росту аксонов и, возможно, направляют нейриты путем синтеза тромбоспондина, IGF1, NT3 и направляющих молекул, таких как Slit, Netrin; а также ингибируют рост, синтезируя RGMa (Chamak et al., 1994; Wehrle et al., 2005; Hata et al., 2006; Ueno et al., 2013; Reemst et al., 2016). Однако детали таких взаимодействий остаются неизученными до настоящего времени. Также не известно, происходят ли такие процессы во время нормального развития ЦНС или лишь при повреждении.

В настоящем исследовании отмечено, что на ранних стадиях развития (начиная с E15) Iba-1-иммунопозитивные клетки накапливаются в области формирования передней белой спайки. Эта структура (*commissura alba anterior*) представляет собой пучок нервных волокон комиссуральных интернейронов, обеспечивающих связь с нейронами на контралатеральной стороне спинного мозга. Возможно, выявленные в данной области микроглиальные клетки могут оказывать влияние, совместно с клетками донной пластинки, на прохождение нейритами срединной линии СМ. В исследованиях, проведенных *in vitro*, продемонстрировано, что микроглия принимает активное участие в росте нейритов путем экспрессии BDNF, секреции плазминогена и тромбоспондина (Nagata et al., 1993; Chamak et al., 1994; Yang et al., 2012). Считается, что микроглия, локализованная в области формирующихся трактов белого вещества в различных отделах головного мозга, способствует росту аксонов, формирует путь роста пучка отростков нейронов путем фагоцитоза избыточных клеток и отростков, устраняя гибнущие аксоны. Также можно предположить, что микроглиоциты формирующейся зоны передней белой спайки участвуют в контроле процесса формирования пучка нервных волокон из отдельных аксонов (фасцикуляции аксонов). В пользу этого предположения свидетельствуют результаты исследований Понт-Лезика с соавт. (2014). На модели системного пренатального воспаления и с истощением популяции микроглиоцитов авторами было продемонстрировано, что изменение активности микроглии мозолистого тела привело к дефасцикуляции дорсальных каллозальных аксонов (Pont-Lezica et al., 2014).

С применением двойного маркирования нами показано, что в формирующемся белом веществе передних рогов СМ крыс часть Iba-1-содержащих клеток, преимущественно веретенновидной формы, располагаются в непосредственной близости от тонких Vim-иммунопозитивных отростков радиальной глии, а также в контакте с субпиальными ножками радиальной глии, образующими пограничную глиальную мембрану. Взаимодействие

микроглиоцитов с радиальной глией было отмечено ранее в формирующейся сетчатке глаза (Sanchez-Lopez et al., 2004) и в развивающемся спинном мозге мышей (Rezaie, Male, 1999; Rigato et al., 2011). Такое расположение может свидетельствовать о радиальной миграции развивающихся микроглиоцитов по отросткам радиальной глиии. Кроме того, по литературным данным известно, что микроглиоциты, продуцируя оксид азота (NO), способны регулировать переход от нейрогенеза к глиогенезу и способствовать созреванию астроглии (Béchade et al., 2011). Для понимания взаимодействия этих двух глиальных популяций в эмбриогенезе требуются дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что первые клетки ранней микроглии обнаруживаются в дорзальной части СМ на 12 сут пренатального развития. В вентральной части эмбрионального СМ единичные микроглиоциты появляются на 14 сут, в период формирования ДСХ-содержащих нейробластов. Скопления микроглиоцитов в этой области наблюдаются, начиная с 15 сут, в период накопления синаптофизина и активного функционирования нейронных цепей. В дальнейшем в вентральной части СМ постоянно присутствуют группы клеток микроглии, вероятно, осуществляющие регуляцию процесса синаптогенеза, роста отростков дифференцирующихся нейронов и функционирования нейронных цепей. Установлено, что в период с момента появления первых клеток микроглии в вентральной части эмбрионального СМ до рождения количество микроглиоцитов увеличивается более чем в 5 раз. Причем наибольший рост числа микроглиоцитов в вентральной части СМ наблюдается в ранний период эмбриогенеза — между 14 и 15 сут. Отмечено, что микроглиоциты передних рогов спинного мозга в процессе развития претерпевают морфологические изменения: от круглых амeboидных клеток в раннем эмбриогенезе до отростчатых микроглиоцитов на поздних сроках эмбриогенеза и в постнатальном периоде. Установлено, что клетки эмбриональной микроглии СМ находятся в тесных взаимоотношениях не только с отростками ДСХ-иммунопозитивных нейробластов, но и с радиальными глиоцитами. Это свидетельствует о том, что микроглиоциты, как первые дифференцированные клетки СМ, обладающие значительным регуляторным потенциалом, оказывают влияние как на нейрогенез, так и на глиогенез.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного на-

учного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов — синаптофизин // *Морфология*. 2015. Т. 147. № 1. С. 78–82.
- Колос Е.А., Коржевский Д.Э.* Микроглия спинного мозга в норме и при патологии // *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2020. Т. 12. № 1(44). С. 4–17.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др.* Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии // *Морфология*. 2012. Т. 141. № 2. С. 28–32.
- Altman J., Bayer S.A.* Development of the human spinal cord: An interpretation based on experimental studies in animals. New York: Oxford University Press, 2001. 542 p.
- Béchade C., Pascual O., Triller A., Bessis A.* Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2 // *Mol. Cell. Neurosci.* 2011. V. 46. P. 762–769.
- Bennett M.L., Bennett F.C., Liddelov S.A., et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 12. E1738–E1746.
- Calderó J., Brunet N., Ciutat D., et al.* Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death // *J. Neurosci. Res.* 2009. V. 87. № 11. P. 2447–2466.
- Chaboub L.S., Deneen B.* Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development // *Dev. Neurosci.* 2012. V. 34. P. 379–388.
- Chamak B., Morandi V., Mallat M.* Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting

- thrombospondin // *J. Neurosci. Res.* 1994. V. 38. № 2. P. 221–233.
- Chen V.S., Morrison J.P., Southwell M.F. et al. Histology atlas of the developing prenatal and postnatal mouse central nervous system, with emphasis on prenatal days E7.5 to E18.5 // *Toxicol. Pathol.* 2017. V. 45. P. 705–744.
- Filipello F., Morini R., Corradini I. et al. The microglial innate immune receptor TREM2 is required for synapse elimination and normal brain connectivity // *Immunity.* 2018. V. 48. № 5.
- Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages // *Science.* 2010. V. 330. № 6005. P. 841–845.
- Hata K., Fujitani M., Yasuda Y. et al. RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. № 1. P. 47–58.
- Hua J.Y., Smith S.J. Neural activity and the dynamics of central nervous system development // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. № 4. P. 327–332.
- Kim H.-J., Cho M.-H., Shim W.H. et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects // *Mol. Psychiatry.* 2017. V. 22. P. 1576–1584.
- Kongsui R., Beynon S.B., Johnson S.J., Walker F.R. Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat // *J. Neuroinflammation.* 2014. № 11:182.
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *European J. Histochemistry.* 2015. V. 59. № 3. P. 233–237.
- Kwon S.E., Chapman E.R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons // *Neuron.* 2011. V. 70. № 5. P. 47–54.
- Lenz K.M., Nelson L.H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 698.
- Li Y., He X., Kawaguchi R. et al. Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice // *Nature.* 2020. V. 587. № 7835. P. 613–618.
- Marsters C. M., Nesan D., Far R. et al. Embryonic microglia influence developing hypothalamic glial populations // *J. Neuroinflamm.* 2020. V. 17. P. 146.
- May M.K., Biscoe T.J. An investigation of the foetal rat spinal cord I. Ultrastructural observations on the onset of synaptogenesis // *Cell Tissue Res.* 1975. V. 158. P. 241–249.
- Michell-Robinson M.A., Touil H., Healy L.M. et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair // *Brain.* 2015. V. 138. P. 1138–1159.
- Mosser C.A., Baptista S., Arnoux I., Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future // *Prog Neurobiol.* 2017. V. 149–150. P. 1–20.
- Nagata K., Nakajima K., Takemoto N. et al. Microglia-derived plasminogen enhances neurite outgrowth from explant cultures of rat brain // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1993. V. 11. P. 227–237.
- Pont-Lezica L., Béchade C., Belarief-Cantaut Y. et al. Physiological roles of microglia during development // *J. Neurochem.* 2011. V. 119. № 5. P. 901–908.
- Pont-Lezica L., Beumer W., Colasse S. et al. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation // *Eur. J. Neurosci.* 2014. V. 39. № 10. P. 1551–1557.
- Prasad T., Wang X., Gray P.A., Weiner J.A. A differential developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: insights from genetic analyses of the protocadherin- γ gene cluster // *Development.* 2008. V. 135. № 24. P. 4153–4164.
- Reemst K., Noctor S.C., Lucassen P.J., Hol E.M. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development // *Front. Hum. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 566.
- Rezaie P., Male D. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review // *Microsc. Res. Tech.* 1999. V. 45. P. 359–382.
- Rigato C., Buckinx R., Le-Corronc H. et al. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks // *Glia* 2011. V. 59. № 4. P. 675–695.
- Sanchez-Lopez A., Cuadros M.A., Calvente R. et al. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: A confocal microscopy study // *Glia.* 2004. V. 46. № 3. P. 261–273.
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner // *Neuron.* 2012. V. 74. P. 691–705.
- Stence N., Waite M., Dailey M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices // *Glia.* 2001. V. 33. № 3. P. 256–266.
- Streit W.J., Xue Q.S., Tischer J., Bechmann I. Microglial pathology // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. V. 26. № 2. P. 142.
- Swinnen N., Smolders S., Avila A. et al. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo // *Glia.* 2013. V. 61. № 2. P. 150–163.
- Sufieva D.A., Razenkova V.A., Antipova M.V., Korzhevskii D.E. Microglia and tanycytes of the infundibular recess of the brain in early postnatal development and during aging // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 189–196.
- Tay T.L., Savage J.C., Hui C.W. et al. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition // *J. Physiol.* 2017. V. 595. № 6. P. 1929–1945.
- Tien A.C., Tsai H.H., Molofsky A.V. et al. Regulated temporal-spatial astrocyte precursor cell proliferation involves BRAF signalling in mammalian spinal cord // *Development.* 2012. V. 139. P. 2477–2487.
- Tremblay M.E., Lowery R.L., Majewska A.K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. e1000527.
- Tseng C.Y., Ling E.A., Wong W.C. Light and electron microscopic and cytochemical identification of amoeboid microglial cells in the brain of prenatal rats // *J. Anat.* 1983. V. 136. Pt 4. P. 837–849.

- Ueno M., Fujita Y., Tanaka T. et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5. P. 543–551.
- Vaughan J.E., Grieshaber J.A. A morphological investigation of an early reflex pathway in developing rat spinal cord // *J. Comp. Neurol.* 1973. V. 148. № 2. P. 177–209.
- Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 13. P. 3974–3980.
- Wang C.C., Wu C.H., Shieh J.Y. et al. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain // *J. Anat.* 1996. V. 189. Pt 3. P. 567–574.
- Wehrle R., Camand E., Chedotal A. et al. Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions // *Eur. J. Neurosci.* 2005. V. 22. P. 2134–2144.
- Yang H., Feng G.D., Liang Z. et al. In vitro beneficial activation of microglial cells by mechanically-injured astrocytes enhances the synthesis and secretion of BDNF through p38MAPK // *Neurochem. Int.* 2012. V. 61. № 2. P. 175–186.

Developmental Changes of Spinal Cord Microglia Indicate its Participation in the Regulation of Neuronogenesis and Synaptogenesis

E. A. Kolos^{1,*} and D. E. Korzhevskii¹

¹*Institute of Experimental Medicine, ul. Acad. Pavlova, 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: koloselena1984@yandex.ru*

In the present study, the localization and distribution of microglia in the rat embryonic spinal cord (SC) during motor neuron precursors formation were studied. Anti-Iba1 antibody was used to identify microglia. The following immunohistochemical markers were used to study the dynamics of the embryonic SC cells development: vimentin (a marker of radial glia), doublecortin (a neuroblasts marker) and synaptophysin (a marker of synaptic vesicles). It was shown that microglia precursors penetrate into the dorsal part of the developing spinal cord at day 12 of gestation and are identified in the developing motor neurons region at embryonic day 14. It was found that the cells of embryonic microglia are in close relationship with the processes of the radial glia and the processes of the anterior horns neuroblasts. Comparison of the spinal cord histogenesis processes with the localization and morphological changes of embryonic microglia indicates its participation in synaptogenesis and differentiation of motor neurons (neuronogenesis).

Keywords: rat spinal cord, embryogenesis, microglia, Iba-1, doublecortin, synaptophysin, vimentin, immunohistochemistry

МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ *MSX1* И *PAX9* В РАЗВИТИИ ЗУБОВ. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ВЗВЕШЕННЫХ СЕТЕЙ КО-ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

© 2021 г. Ф. Ванг^a, В. Джианг^{c, d}, Б. Чен^{e, f, g, *}, Р. Ли^{b, c, d, **}

^aКафедра стоматологии, госпиталь Дахуа, Шанхай, 200237 КНР

^bКафедра онкологии полости рта, челюстнолицевой области головы и шеи, медицинский факультет ДжиаоТонг университета Шанхая, Шанхай, 200011 КНР

^cНациональный клинический исследовательский центр заболеваний полости рта, Шанхай, 200011 КНР

^dШанхайская центральная лаборатория стоматологии и шанхайский институт стоматологии, Шанхай, 200011 КНР

^eКафедра отоларингологии и хирургии лица и головы медицинский факультет ДжиаоТонг университета Шанхая, Шанхай, 200011 КНР

^fИнститут уха, ДжиаоТонг университет Шанхая, Шанхай, 200011 КНР

^gШанхайская центральная лаборатория трансляционной медицины заболеваний уха и носа, Шанхай, 200011 КНР

*e-mail: liaochengzhuikao@163.com

**e-mail: chbent@163.com

Поступила в редакцию 04.11.2020 г.

После доработки 26.01.2021 г.

Принята к публикации 29.01.2021 г.

Изучен механизм участия генов *Msx1* и *Pax9* в развитии зубов у мыши. Данные микрочипов GSE32321, которые содержали образцы орального эпителия (Epi) и зубных мезенхимальных клеток (Mes) мышей, экспрессирующих *Msx1* и *Pax9* и нокаутных по данным генам, были использованы для идентификации дифференциально экспрессируемых генов (DEGs). Затем наиболее значимые генные модули были исследованы в группах Epi-*Msx*, Epi-*Pax*, Mes-*Msx* и Mes-*Pax* с помощью анализа взвешенных сетей ко-экспрессии генов (WGCNA). Анализ базы данных Gene Ontology (GO) и скрининг генов-центральных узлов регуляторной сети были выполнены на модулях с наибольшей релевантностью. Всего выявлено 1467, 986, 1212, и 1293 DEGs соответственно в группах Epi-*Msx*, Epi-*Pax*, Mes-*Msx* и Mes-*Pax*. Были идентифицированы четыре ассоциированных генных модуля. Применение метода анализа обогащения по функциональной принадлежности (база данных GO) позволило показать, что эти гены оказывают негативное регуляторное воздействие на пролиферацию клеток, клеточную адгезию, развитие кровеносных сосудов и морфогенез кровеносных сосудов. В качестве основных генов определены *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* и *CBLN1*, уровень экспрессии которых варьировал в разные моменты времени. Более того, показано, что *IDH3A* и *CBLN1* вовлечены в окислительно-восстановительные метаболические процессы с участием коэнзимов, а также в межклеточную адгезию. Мы предполагаем, что *Msx1* и *Pax9* являются ключевыми, но не единственными регуляторами процесса формирования зубов у мышей. В этот процесс также могут быть вовлечены гены *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* и *CBLN1*.

Ключевые слова: *Msx1*, *Pax9*, механизмы развития зубов, WGCNA

DOI: 10.31857/S0475145021030083

ВВЕДЕНИЕ

Развитие зубов, начиная с пролиферации и дифференцировки клеток и до формирования зуба на макроморфологическом уровне, регулируется серией точно скоординированных сигналов (Jheon et al., 2013; Li et al., 2013). Развитие зубов млекопитающих происходит в результате взаимодействия клеток эпителия эктодермы челюсти (Epi) и клеток одонтогенной мезенхимы (Mes), производных нервного гребня (Thesleff,

2003). Важную роль в регуляции морфогенеза и взаимного расположения зубов играют взаимодействия между эпителием зачатка зуба и клетками одонтогенной мезенхимы, формирование эктодермального эпителия челюсти, дифференциальная экспрессия генов в мезенхимальных клетках, а также локальные сигналы, регулирующие морфогенетические движения клеток зачатка зуба (Bei, 2009; Jussila, Thesleff, 2012). Исследования молекулярных механизмов развития диспла-

зии зубов у мышей подтвердили, что формирование зубов строго контролируется генетически. На сегодняшний день известно не менее 200 генов, которые детерминируют расположение, количество, размер и форму каждого зуба (Thesleff, 1998; Arte, 2001).

Мутантная форма Paired Box Gene 9 (*Pax9*) выявлена в локусе 14q12-13 генома, длина мРНК этого гена составляет 1630 п.о. Гомозиготные мыши с дефицитом *Pax9* умирают вскоре после рождения (Peters et al., 1998). У таких мышей наблюдается полная потеря зубов и дефекты развития, такие как расщелина верхнего неба и деформация хрящевых структур. Эмбриональное развитие зубов при нокауте *Pax9* оказывается заблокировано на стадии почки. Это указывает на то, что *Pax9* необходим для развития зубов на более поздних стадиях, чем стадия почки (Peters et al., 1998). Отсутствие *Msx1* приводило к краниофациальным дефектам развития, включая расщелину неба, нарушение развития резцов, недоразвитие альвеолярной кости нижней челюсти и окончание эмбрионального развития зубов на стадии почки (Satokata, Maas, 1994). На основании этих данных можно сделать вывод о том, что *Pax9* и *Msx1* играют важную роль в регуляции развития зубов, однако механизм их действия неизвестен.

Метод анализа взвешенных сетей ко-экспрессии (Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) – это мощный метод системной биологии для анализа молекулярных механизмов регуляции развития и взаимодействий компонентов генетических регуляторных сетей (Langfelder, Horvath, 2008). Этот метод позволяет выделить модули ко-экспрессирующихся генов на основе матрицы попарных корреляций между экспрессией генов, а затем идентифицировать клинически значимые модули, выявить ключевые регуляторные гены в сигнальном пути и оценить внутримодульные связи и роли генов (Oldham et al., 2008). Благодаря использованию метода WGCNA, Канг и соавторы (Kang et al., 2016) успешно идентифицировали гены *TMEM229A*, *LEPREL1*, and *GAD1* как узловые гены (hub-гены), продукты которых необходимы для онтогенетического перехода от молочных к постоянным зубам. Они сделали вывод о ключевой роли в регуляции этого процесса следующих модулей: кальциевого сигнального пути (calcium signaling pathway), взаимодействий рецепторных белков клетки с внеклеточным матриксом (ECM-receptor interactions) и нейроактивных взаимодействий лиганд-рецептор (neuroactive ligand-receptor interactions). Другой коллектив авторов (Jia et al., 2016), используя WGCNA, показали, что *hsa-miR-376a-2*, *hsa-miR-376a-1*, *hsa-miR-15a* и *hsa-miR-424* могут быть ассоциированы с болезнью Альцгеймера. Использование метода WGCNA в комбинации с данными по генетическим маркерам позволило идентифицировать *USIF*

и *EADs3* как гены, участвующие в возникновении семейной комплексной гиперлипидемии (Plaisier et al., 2009).

Ранее О'Коннелл и соавторы (O'Connell et al., 2012) применили подход системной биологии для реконструкции развития зуба как сложного органа, состоящего из нескольких тканей. Авторы использовали данные, полученные с помощью микрочипов (GEO accession: GSE32321), анализ профиля экспрессии для генома в целом, данные из литературы, интегративный биоинформатический анализ и генетические модели *in vivo*. В результате были выявлены ключевые взаимодействия между эпителиальным и мезенхимальным компартментами формирующегося зуба, основанные на обратной связи между сигнальными путями Wnt и Wnt.

В настоящем исследовании мы использовали данные GSE32321 из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) и применили метод WGCNA для всестороннего изучения механизма взаимодействия *Pax9* и *Msx1* в процессе развития зубов. Цель нашего исследования была следующая: выявить, с использованием различных биоинформатических методов анализа, возможные механизмы взаимодействия *Pax9* и *Msx1* в развитии зубов мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение данных

Данные микрочипов GSE32321 (O'Connell et al., 2012), были загружены из GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Данные представляли собой 105 связанных образцов эпителия ротовой полости и дентальных мезенхимальных клеток мыши, собранных на E10.0, E11, E11.5, E12.0, E12.5, E13.0, E13.5, и E14.5 дни развития. Мы сконцентрировались на роли *Msx1* и *Pax9* в развитии зубов мыши на E13.5 день онтогенеза. Были проведены следующие сравнения: эпителий, *Msx1* wildtype ($n = 3$) vs. knockout ($n = 3$); мезенхима, *Msx1* wildtype ($n = 3$) vs. knockout ($n = 3$); эпителий *Pax9* wildtype ($n = 3$) vs. knockout ($n = 3$); мезенхима, *Pax9* wildtype ($n = 3$) vs. knockout ($n = 3$). Кроме того, образцы, собранные на других стадиях развития, использовались для проведения анализа динамики экспрессии ключевых генов (табл. 1).

Предварительная обработка данных

Файлы аннотаций зондов использовались для сопоставления зондов с соответствующими генами. Те зонды, для которых было выявлено более одного гена, были отброшены, но за начальное значение экспрессии гена, соответствующего нескольким зондам, было взято среднее значение по всем соответствующим зондам. Чтобы приблизить смещенное распределение данных к нормальному, данные были \log_2 -трансформированы.

ны, а затем нормализованы методом среднеквадратичной нормализации (Troyanskaya et al., 2001; Fujita et al., 2006).

Скрининг дифференциально экспрессирующихся генов (DEGs)

Пакет limma (Gentleman et al., 2006) в R 3.1.3 был использован для определения дифференциально экспрессирующихся генов и соответствующих уровней значимости (p-value) в группах сравнения: эпителий, *Msx1* wildtype vs. knockout; мезенхима, *Msx1* wildtype vs. knockout; эпителий *Pax9* wildtype vs. knockout; мезенхима, *Pax9* wildtype vs. knockout. Метод Benjamini–Hochberg (BH) (Benjamini, Hochberg, 1995) использовался для оценки уровня ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) (Benjamini, 2010) и поправки на множественное тестирование.

Гены с $FDR < 0.05$ и $|\lg FC| > 1$ считались дифференциально экспрессирующимися.

С помощью R-пакета pheatmap для генов, дифференциально экспрессирующихся в группах Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx, и Mes-Pax, был проведен иерархический кластеринг (Szekely, Rizzo, 2005; Press et al., 2007) и построены тепловые карты на основе Евклидовых расстояний (Deza, Deza, 2009).

Построение сети ко-экспрессии и идентификация клинически значимых модулей

Пакет R программы WGCNA (<https://labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/>) был использован для построения сети ко-экспрессии для дифференциально экспрессирующихся генов в 4 группах. Сначала была использована функция WGCNA pickSoftThreshold для вычисления мягкого порогового значения β с учетом критерия безмасштабности сети. Затем была построена взвешенная матрица смежности по формуле $a_{mn} = |c_{mn}|^\beta$ (c_{mn} = корреляция Пирсона для гена m и гена n ; a_{mn} = значение функции смежности для пары генов m и n , параметр сходства). Затем матрица смежности была заменена на матрицу топологического сходства (ТОМ). Топологическое перекрытие проведено с учетом степени несходства. Для идентификации модулей генов использовался гибридный метод динамического обрезания дендрограммы. Минимальный размер для полученных дендрограмм составлял 30.

Идентификация клинически значимых модулей

Для того, чтобы определить, какие модули имеют отношение к развитию зубов, был использован T test для определения уровня значимости (P-value) для мРНК-кандидатов в группах Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax. Значимость

Таблица 1. Информационная таблица GSE32321

	Мезенхима	Эпителий
E10	2	2
E10_Bmp4	3	—
E10_FGF8	3	—
E10-Gsk3b	3	—
E10-SSH	3	—
E11	2	2
E11.5	3	3
E12	3	3
E12.5	3	3
E13	5	5
E13_Bmp4	—	3
E13_FGF8	—	3
E13-Gsk3b	—	3
E13-SSH	—	3
E13.5	3	3
E13.5_Msx1_null	3	3
E13.5_wildtype_Msx1_Epi_1	3	3
E13.5_Pax9_null_Epi_1	3	3
E13.5_wildtype_Pax9_Epi_1	3	3
E14	—	2

для каждого гена (GS) определялась как \lg_{10} от P-value. В качестве значения модуля (MS) использовали среднее значение GS данного модуля. Как правило, модуль с самым высоким значением MS оценивался как связанный с заболеванием, а наиболее релевантный в отношении заболевания модуль в 4 группах был построен при помощи программы Cytoscape 2.8.2 (Smoot et al., 2010).

Анализ функционального обогащения

Гены, входящие в генетическую регуляторную сеть, были сопоставлены с функциональными узлами в GO, а для анализа биологических процессов использовался программный пакет Gostat (Falcon and Gentleman, 2006). P-value < 0.05 был принят как пороговое значение.

Поиск узловых (hub) генов и горизонтальное сравнение значений экспрессии hub-генов

Степень связности узла — это количество межгенных связей, сходящихся в нем (Estrada, 2006). Узлы с более высокой степенью связности играют значительную роль в построенной сети (Jeong et al., 2001) и рассматриваются в качестве hub-генов. При подсчете степеней узлов были выбраны hub-гены из сетей Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и

Таблица 2. Количество модулей и количество генов в четырех выделенных группах

	№ модуля	Черный	Синий	Коричневый	Зеленый	Серый	Красный	Бирюзовый	Желтый
EPI-13.5-Msx	6	—	237	198	79	265	—	588	100
EPI-13.5-Pax	5	—	206	157	—	205	—	295	123
MES-13.5-Msx	6	—	173	84	58	221	—	615	61
MES-13.5-Pax	8	54	308	152	61	192	58	406	62

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между каждым цветовым модулем и заболеваниями в четырех исследованных группах

	№ модуля	Черный	Синий	Коричневый	Зеленый	Серый	Красный	Бирюзовый	Желтый
EPI-13.5-Msx	6	—	0.86	0.92	0.71	0.28	—	0.78	0.8
EPI-13.5-Pax	5	—	0.87	0.91	—	0.3	—	0.9	0.82
MES-13.5-Msx	6	—	0.93	0.79	0.8	0.25	—	0.9	0.81
MES-13.5-Pax	8	0.81	0.89	0.92	0.82	0.27	0.63	0.83	0.71

Mes-Pax соответственно. Кроме того, значения экспрессии hub-генов выбирались и сравнивались в разных временных точках. Анализ обогащения GO для 10 ведущих hub-генов также проводился с использованием Gostat (Falcon, Gentleman, 2006) с P -value < 0.05 в качестве порогового значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скрининг дифференциально экспрессирующихся генов

В результате скрининга в общей сложности 1467 дифференциально экспрессирующихся генов (DEGs) были обнаружены в группе Epi-Msx, 986 DEGs – в Epi-Pax, 1212 – в Mes-Msx, и 1293 – в Mes-Pax. Иерархическая кластеризация DEGs в четырех группах показана на рис. 1. Значения экспрессии DEGs значительно различались между контрольными и нокаутными образцами в каждой группе. Поэтому все образцы были надежно дифференцированы на основании экспрессии DEGs.

Построение сети ко-экспрессии и идентификация ее ключевых модулей

Для того, чтобы проверить, содержались ли в образцах “выпадающие” значения, были проанализированы графики кластеризации DEGs в группах Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax (рис. 2). Анализ показал, что образцы всех четырех групп не содержали существенных “выбросов”. В целях соответствия требованию безмасштабности сети, было проанализировано значение “мягкого” порога β . Значение β при достижении R^2 0.9 составляло 16 для Epi-Msx, 14 – для Epi-Pax, 18 – для Mes-Msx и 16 – для Mes-Pax (рис. 3).

В соответствии с кластеризацией после динамического обрезания дендрограммы, высоко коррели-

рованные гены были сгруппированы в модули. Всего в Epi-Msx было 6 модулей, в Epi-Pax – 5, в Mes-Msx – 6, в Mes-Pax – 8 (табл. 2). Кроме того, количество генов, соответствующих собственным цветовым модулям, несколько отличалось друг от друга (рис. 4).

Далее был проведен анализ модулей, которые наиболее значимо ассоциировались с клиническими признаками, и, следовательно, имели биологическое значение. Группы Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax содержали многочисленные модули генов, которые были достоверно связаны с заболеваниями. Кроме того, было установлено, что коричневый (рис. 5а), коричневый (рис. 5б), синий (рис. 5в) и коричневый модули (рис. 5г) являются наиболее релевантными модулями генов, имеют наибольшую значимость (с коэффициентом корреляции >0.9) в группах Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax соответственно (табл. 3). Модули, обладающие высокой ассоциативностью с определенными клиническими признаками в различных группах, показаны в ко-экспрессионной сети (рис. 6).

GO-анализ обогащения

Основные DEGs в ключевых модулях были проанализированы с помощью анализа оверпредставленных терминов GO. В частности, в “коричневом” модуле группы Epi-Msx было выявлено обогащение термина “отрицательная регуляция пролиферации клеток” (GO:0008285). В “коричневом” модуле группы Epi-Pax был обогащен термин “цитозоль” (GO:0005829). В “синем” модуле группы Mes-Msx был в значительной степени обогащен термин “клеточная адгезия” (GO:0007155). В “коричневом” модуле группы Mes-Pax были достоверно обогащены термины “клеточная адгезия” (GO:0007155), “развитие кровеносных со-

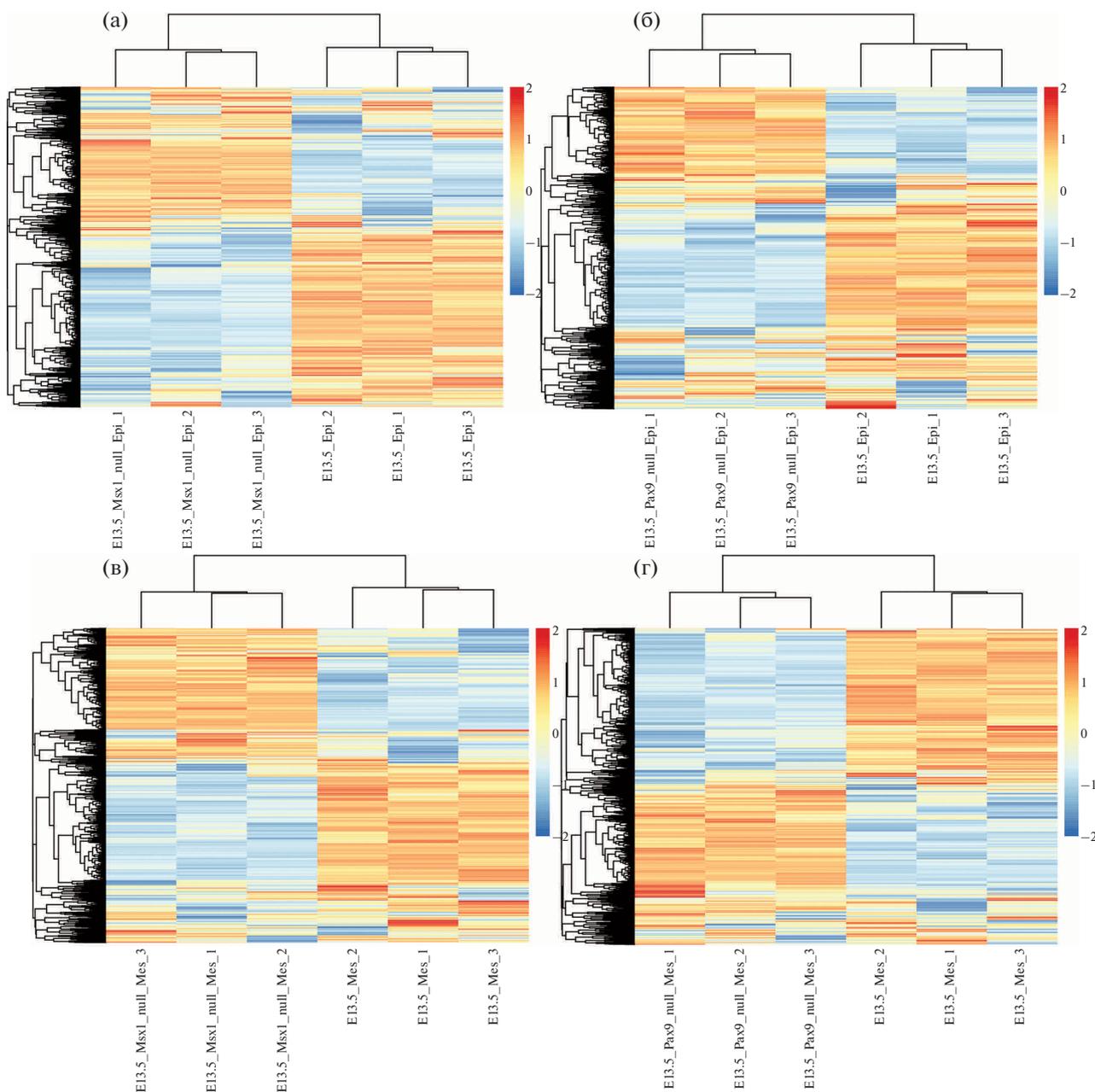


Рис. 1. Цветовая карта значений экспрессии генов в группах: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax.

судов” (GO:0001568) и “морфогенез кровеносных сосудов” (GO:0048514) (рис. 7).

Уровни экспрессии *hub*-генов на различных стадиях развития зубов *t*

На основе сети, показанной на рис. 6, были выявлены *hub*-гены с наиболее высокой степенью достоверности. Такими *hub*-генами в сетях Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax групп были, соответственно, каталитическая субъединица 3-альфа (*IDH3A*) изоцитрат-дегидрогеназы

(NAD(+)), саркоспан (*SSPN*), альфа цепь коагуляционного фактора XIII (*F13A1*) и предшественник Cerebellin 1 (*CBLN1*). На рис. 8 показаны уровни экспрессии вышеупомянутых *hub*-генов на разных стадиях развития зуба. Экспрессия гена *IDH3* была самой высокой на начальной стадии E10, но постепенно снижалась с течением времени и снова увеличивалась со стадии E11.5. Экспрессия гена *F13A1* поднялась до самого высокого уровня на стадии E11, затем постепенно снижалась и достигла самого низкого уровня на стадии E13. На стадии E13.5 экспрессия гена *F13A1* вне-

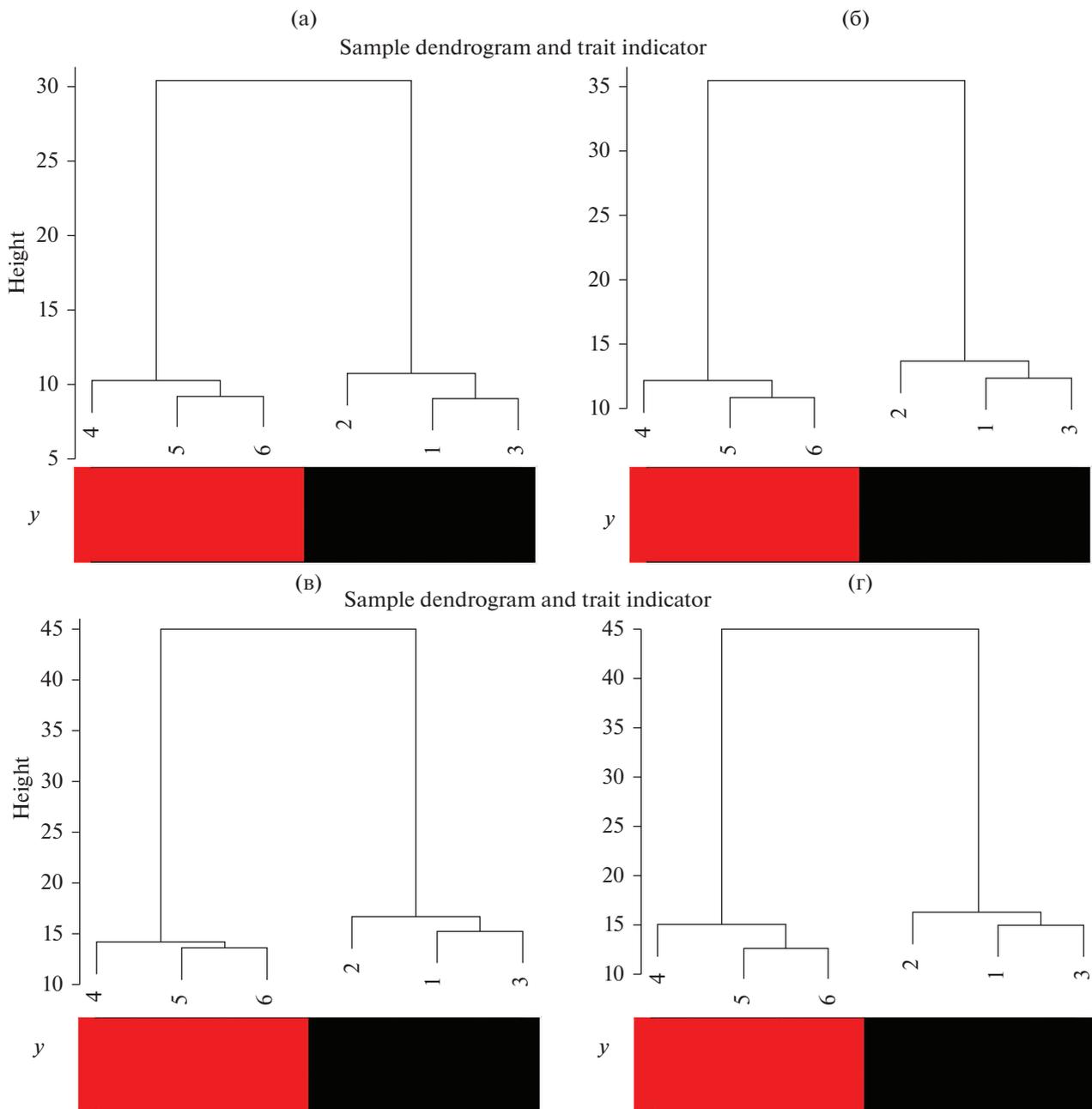


Рис. 2. Анализ кластеризации генов по группам: (а) – Eri-Msx, (б) – Eri-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax. Красным выделены образцы от нокаутных особей, черным – норма, контрольные образцы.

запно значительно увеличилась. Экспрессия гена *SSPN* была самой высокой на начальной стадии E11 по сравнению с другими временными точками. С течением времени экспрессия постепенно снижалась, а затем усиливалась, начиная со стадии E12.5. После этого уровень экспрессии выравнивался, оставаясь в пределах небольшого диапазона изменений. Показатели экспрессии гена *CBLN1* медленно снижались со стадии E10–E11.5 и внезапно резко возросли на стадии E12, после чего тенденция к быстрому росту продолжилась до

конца изученного временного интервала. Кроме того, был проведен анализ оверпредставленных терминов GO для 10 ведущих hub-генов (рис. 9). Было обнаружено, что в hub-узлах группы Eri-Msx обогащены такие ключевые функции как “окислительно-восстановительный метаболический процесс коферментов” (GO:0006733). Примечательно, что ген *IDH3A* также был вовлечен в реализацию этих функций. Для hub-узлов в группе Eri-Pax была в основном характерна “клеточная адгезия через молекулы адгезии, ассоциированные с цитоплазма-

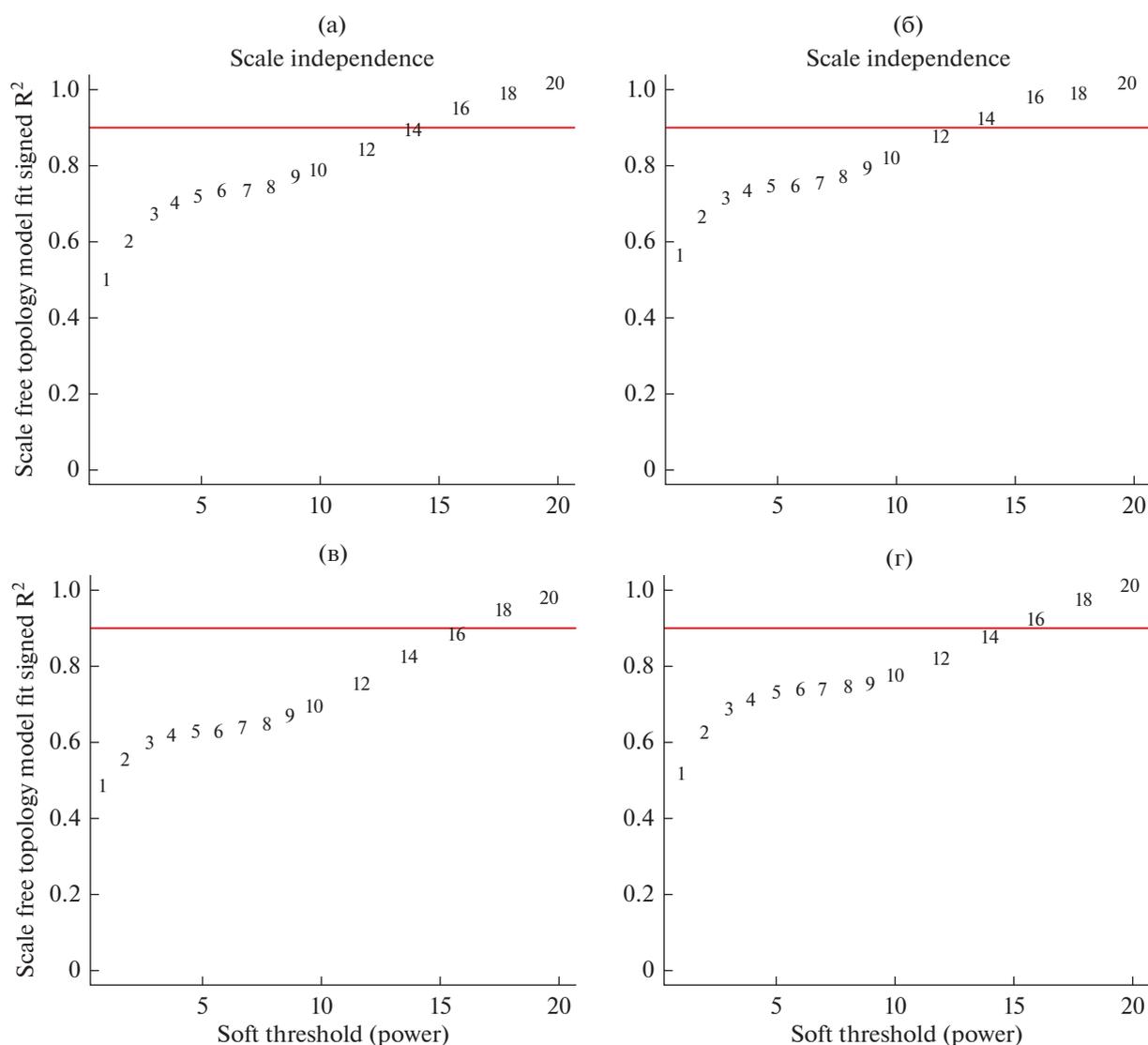


Рис. 3. Определение мягкого порогового значения для взвешенного анализа генетической регуляторной сети ко-экспрессии для групп: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax.

тической мембраной” (GO:0098742). Hub-узлы в группе Mex-Msx были значительно обогащены термином “дифференцировка шванновских клеток” (GO:0014037), а в группе Mex-Pax – термином “клеточная адгезия через молекулы адгезии, ассоциированные с цитоплазматической мембраной” (GO:0098742), как и hub-узел *CBLN1*. В то же время *SSPN* и *F13A1* не получили какого-либо обогащения ни по одной из функций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Зубы млекопитающих формируются в процессе органогенеза, основанного на саморегулирующихся взаимодействиях между эпителием и мезенхимой (Saxen, Thesleff, 1998). У мышей наблюдается несколько стадий развития зуба. Во-первых, на

месте будущего зуба формируется эпителиальная плакада (локальное утолщение эпителия челюстной эктодермы) (день E11.5). Затем утолщенный зубной эпителий начинает вторгаться в лежащую под ним одонтогенную мезенхиму, которая затем конденсируется вокруг него (день E12). Этот процесс приводит к формированию почки зуба (день E13). Недавние исследования показали, что диффундирующие факторы роста могут служить сигнальными молекулами, обеспечивающими взаимодействие эпителия и мезенхимальных клеток в органогенезе зуба, а также в активацию или ингибирование экспрессии генов, связанных с развитием зуба. В процессе развития зуба транскрипционный фактор Msx в основном играет роль медиатора передачи сигнала (Chen et al., 1996). Кроме того, Pax9, который непрерывно

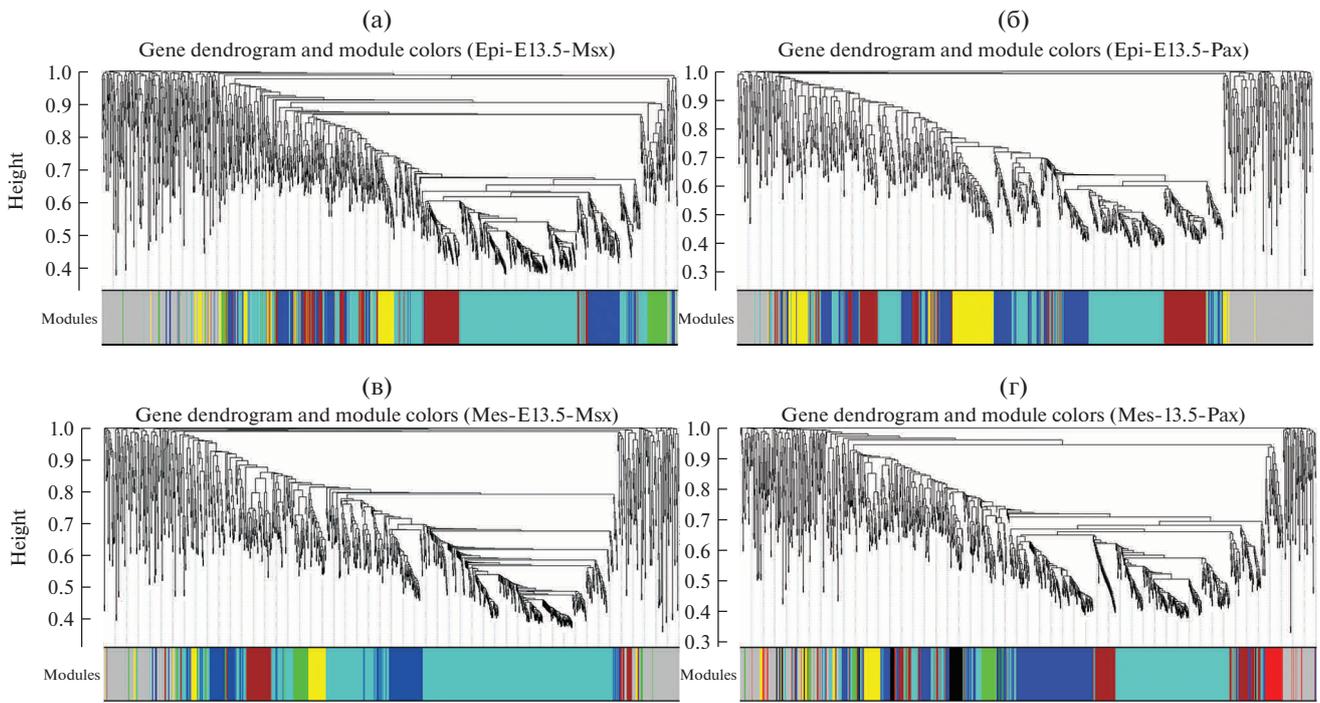


Рис. 4. Кластерная дендрограмма (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx , (г) – Mes-Pax.

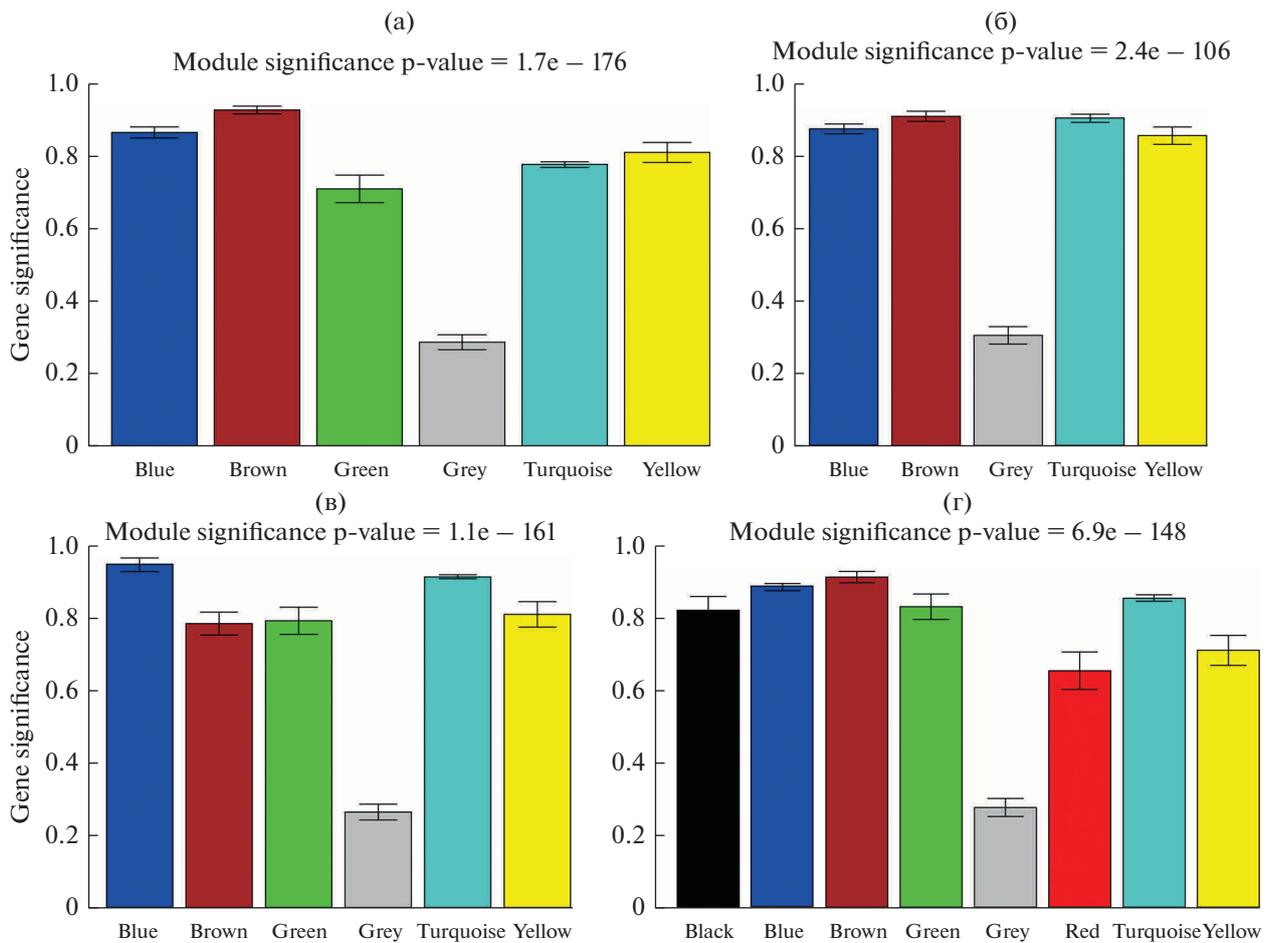


Рис. 5. Распределение среднего GS и ошибок в модулях групп: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx , (г) – Mes-Pax.

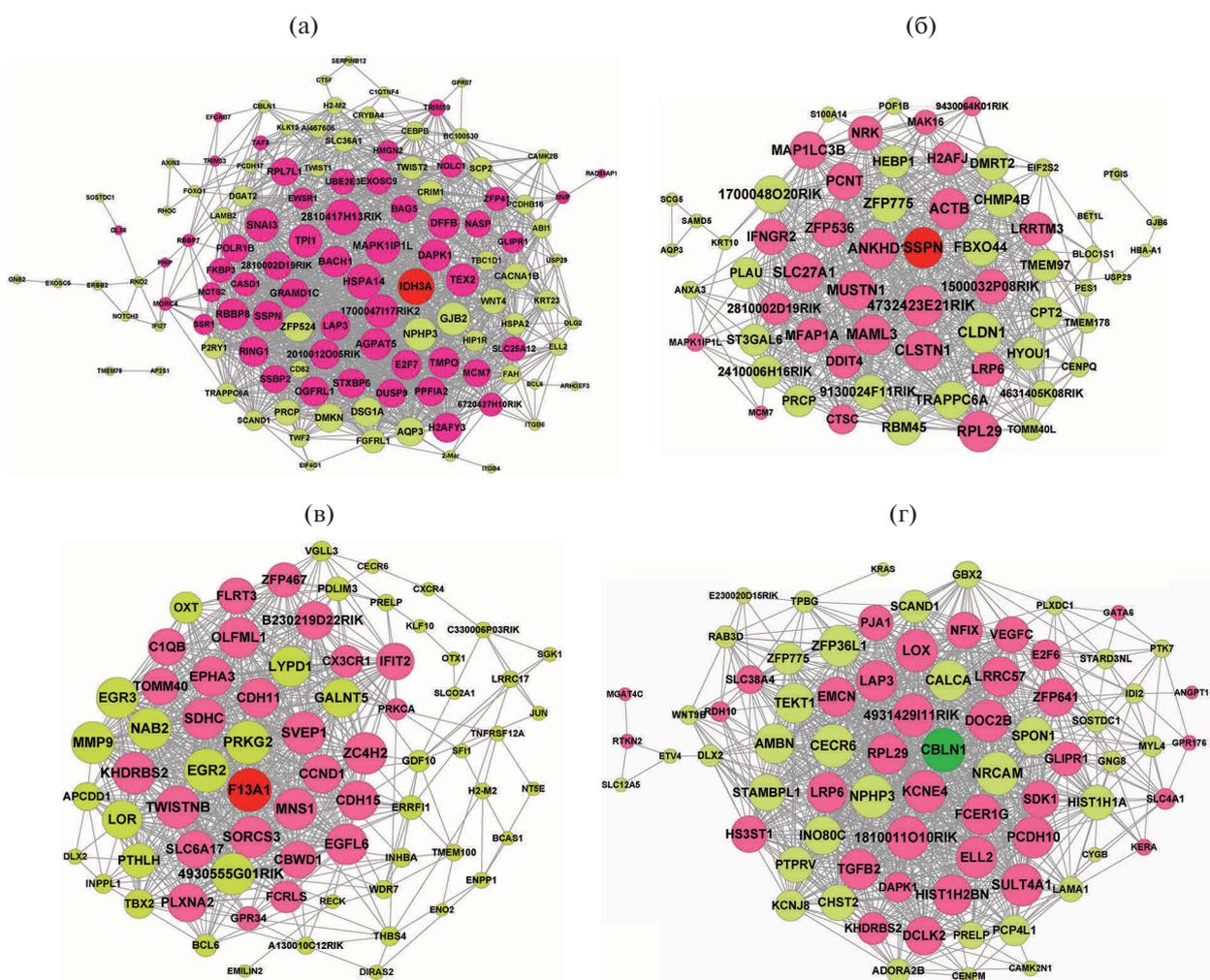


Рис. 6. Сети ко-экспрессии: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax. Розовым и красным обозначены узлы с повышенным уровнем экспрессии, зеленым и желтым – узлы со сниженной экспрессией. Красные и зеленые узлы являются hub-узлами, которые имеют более высокий ранг в сети и являются предметом данного исследования. Размер круга соответствует уровню узла в сети. Линиями обозначены взаимодействия между узлами.

экспрессируется в одонтогенной мезенхиме, является важным регулятором морфогенеза именно мезенхимальной, а не эпителиальной ткани зуба. Этот ген может быть использован в качестве маркера одонтогенной мезенхимы. Пониженная экспрессия *Pax9* может привести к апоптозу зачатка зуба. Более того, экспрессия *Pax9* также позволяет мезенхимальному зачатку на стадии почки зуба приобрести способность индуцировать эктопический эпителий к формированию зуба (Tucker et al., 1998).

При сравнении профилей экспрессии генов *Msx1* и *Pax9*, были показаны значительные различия между образцами дикого типа и нокаут-образцами эпителия и мезенхимы. Таким образом, мы подтвердили, что *Msx1* и *Pax9* играют важную роль в развитии зуба. Анализ оверпредставленных терминов GO позволил установить, что DEGs

участвуют в негативной регуляции клеточной пролиферации, адгезии клеток, развитию кровеносных сосудов и морфогенезе кровеносных сосудов. Hub-генами групп Epi-Msx, Epi-Pax, Mes-Msx и Mes-Pax были, соответственно, *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* и *CBLN1*. При сравнении экспрессии этих генов в каждой временной точке можно убедиться, что средние значения экспрессии *IDH3A*, *F13A1*, *SSPN* и *CBLN1* в разных временных точках были разными. Кроме того, *IDH3A* был значительно обогащен термином GO, связанным с метаболическим процессом окисления кофермента, а *CBLN1* – термином GO, связанным с клеточной адгезией.

Сравнение профиля экспрессии генов здоровых и патологических тканей десны выявило 61 группу дифференциально экспрессирующихся генов (TOP 2). Гены этих групп негативным образом

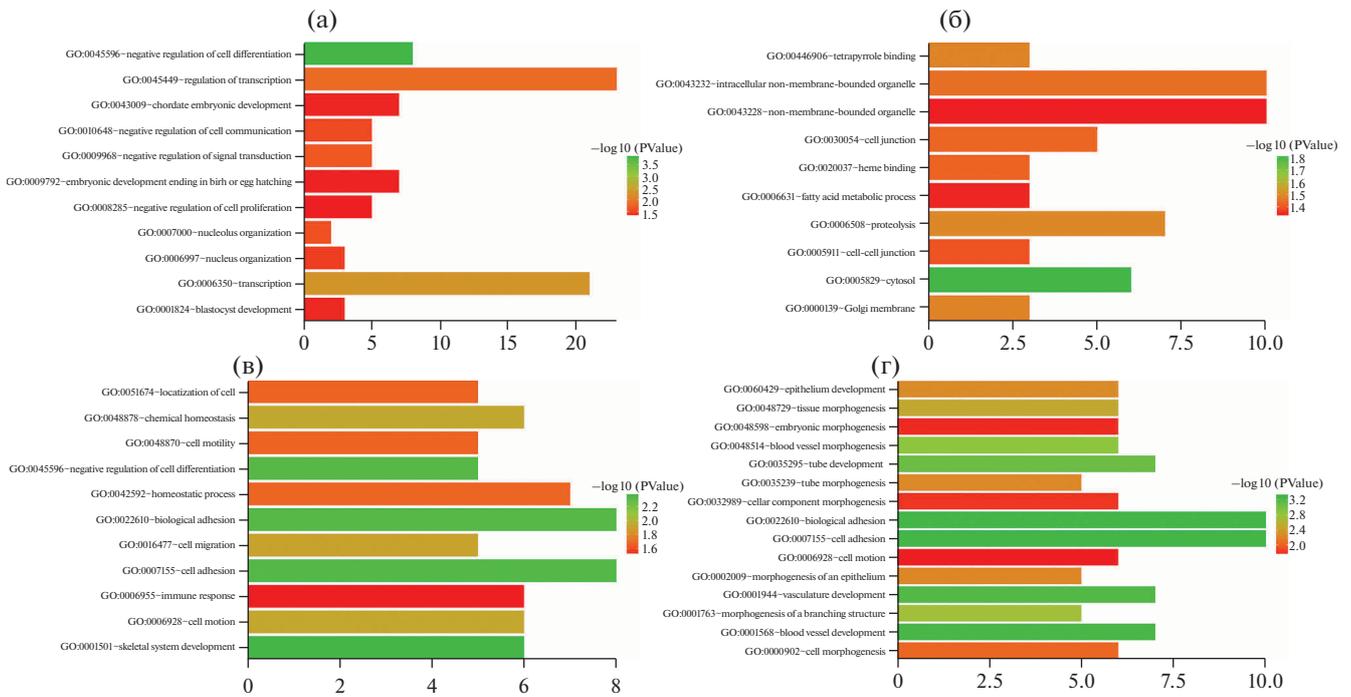


Рис. 7. Gene Ontology (GO) анализ обогащения для модулей групп (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax.

регулируют клеточную пролиферацию (Demmer et al., 2008). Аналогичным образом, негативная регуляция клеточной пролиферации достоверно коррелировала с процессами развития зубов в группе Epi-Msx. Предыдущее исследование выявило изменения ранней экспрессии генов в клетках пульпы зуба человека (HDPC), обработанных диметакрилатом триэтиленгликоля (TEGDMA) (использовалась концентрация с низкой токсичностью). Кластерный анализ обогащения групп GO выявил, что DEGs были связаны с адгезией клеток, разви-

тием кровеносных сосудов и морфогенезом кровеносных сосудов (Cho et al., 2014). Это объясняется тем, что изменения в тканях пульпы влияют на рост зубов. Аналогичным образом, анализ обогащения терминами GO для группы Mes-Pax показал связь с клеточной адгезией, морфогенезом кровеносных сосудов, развитием кровеносных сосудов. Анализ обогащения для группы Mes-Msx выявил связь с адгезией клеток. По результатам этих исследований, регуляция развития зубов может быть связана с негативной регуляцией клеточной пролиферации, адгезии клеток, развития кровеносных сосудов и морфогенеза кровеносных сосудов.

CBLN1 (cerebellin 1 precursor) является одним из компонентов генетической регуляторной сети гена *TP63*. Он участвует в регуляции одонтогенеза и ранних стадий развития зуба через модуляцию клеточной адгезии, клеточной сигнализации и эпителиально-мезенхимных взаимодействий (Rostampour, 2018). Предыдущие исследования показали, что *CBLN1* необходим для регуляции развития первичного тройничного нерва на ранней стадии формирования зуба. Нерв мог достигать эпителиальных клеток зуба примерно на E10 день, и аксон начал расти до зуба на стадии прорастания (Lumsden, 1988; Kettunen et al., 2005). *CBLN1* был охарактеризован в этом исследовании как hub-ген и участник ко-экспрессионной сети. Было показано, что уровень экспрессии гена *CBLN1* был максимален в начале стадии E10. Примеча-

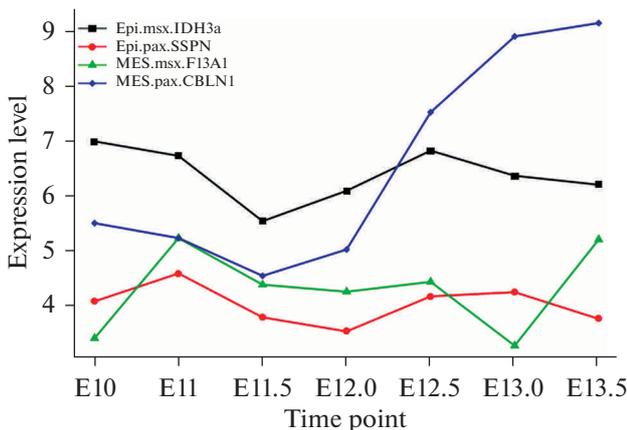


Рис. 8. Кривая динамики экспрессии генов, наиболее сильно связанных в группах: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax в каждый момент времени.

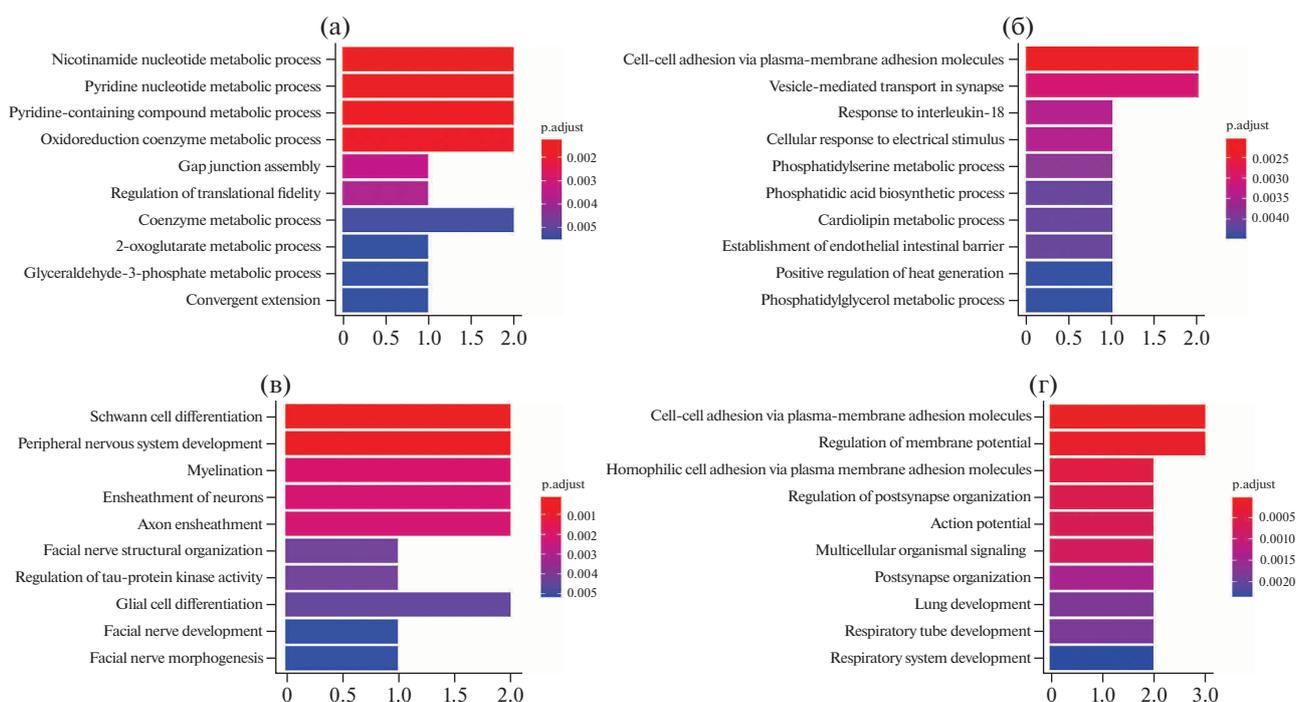


Рис. 9. Gene Ontology (GO) анализ обогащения для 10 наивысших hub-узлов в группах: (а) – Epi-Msx, (б) – Epi-Pax, (в) – Mes-Msx, (г) – Mes-Pax.

тельно, что *CBLN1* был значительно обогащен GO термином “адгезия клеток”. Действительно, взаимодействия клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс играют ключевую роль в модуляции пластичности/жесткости определенных участков эмалевого органа, что влияет на морфогенез зуба (Lesot, Brook, 2009). Основываясь на наших результатах, можно предположить, что в случае снижения уровня экспрессии *Msx1* и *Pax9*, *CBLN1* может играть важную роль на стадии развития зуба E10 посредством регуляции адгезии клеток.

Кроме того, показано, что коэнзим Q10 (rCoQ10) оказывает ранозаживляющее действие на мягкие ткани после удаления зуба у крыс путем регуляции окислительного стресса и эффективности работы митохондрий (Yoneda et al., 2014). Эти данные позволяют предположить, что в развитии зуба может быть задействован процесс метаболизма этого коэнзима. В данном исследовании функция *IDH3A* оказалась значительно обогащена именно для процесса метаболизма данного кофермента. Это позволяет предположить, что *IDH3A* может быть вовлечен в развитие зуба при снижении регуляции *Msx1* и *Pax9* путем участия в метаболическом процессе кофермента. У мышей-мутантов по *IDH3A* была исследована роль *IDH3* в развитии дегенеративного фенотипа сетчатки, но данных об изменении фенотипа зубов у этих мышей нет (Findlay et al., 2018). В настоящее время практически не имеется данных о роли *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1*

в развитии зубов. Однако на основании наших данных может быть сделано предположение, что *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* действительно могут принимать участие в регуляции развития зубов.

Вместе с тем, профиль экспрессии *CBLN1*, *IDH3A*, *SSPN* и *F13A1* не был проверен с использованием таких экспериментальных подходов, как количественный ПЦР анализ, иммуногистохимия или гибридизация *in situ*. Более того, взаимодействия между *Msx1* и *IDH3A* или *SSPN*, а также *Pax9* и *F13A1* или *CBLN1* не были доказаны в исследованиях *in vivo* или *in vitro*. Наконец, потенциальная роль *IDH3A*, *F13A1*, *SSPN* и *CBLN1* в развитии зуба была показана с помощью биоинформатических методов, но не была экспериментально установлена. Для подтверждения наших результатов необходимы дальнейшие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ И МАТЕРИАЛОВ

Данные, использованные для обоснования выводов настоящего исследования, могут быть предоставлены по запросу у соответствующего автора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Ф.В. и В.Дж. внесли одинаковый вклад в работу. Концепция и дизайн исследования: Ф.В. и В.Дж.; сбор данных: Ф.В. и В.Дж.; анализ и интерпретация данных: Р.Л. и Б.Ч.; статистический анализ: Р.Л. и Б.Ч.; написание статьи: Ф.В. и В.Дж.; редактирование рукописи: Р.Л. и Б.Ч. Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arte S.* Phenotypic and genotypic features of familial hypodontia: Academic Dissertation. Helsinki: Helsinki University, 2001. 80 p.
- Bei M.* Molecular genetics of tooth development // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. V. 19. № 5. P. 504–510.
- Benjamini Y.* Discovering the false discovery rate // *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 2010. V. 72. № 4. P. 405–416.
- Benjamini Y., Hochberg Y.* Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. R. Stat. Soc.: Series B Methodol.* 1995. V. 57. № 1. P. 289–300.
- Chen Y., Bei M., Woo I., Satokata I., Maas R.* Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis // *Development.* 1996. V. 122. № 10. P. 3035–3044.
- Cho S., Lee J., Heo J.S., Kim S.* Gene expression change in human dental pulp cells exposed to a low level toxic concentration of triethylene glycol dimethacrylate: an RNAseq analysis // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2014. V. 115. № 3. P. 282–290.
- Demmer R.T., Behle J.H., Wolf D.L. et al.* Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues // *J. Periodontology.* 2008. V. 79. № 11. P. 2112–2124.
- Deza M.M., Deza E.* Encyclopedia of Distances. Berlin: Springer, 2009. 583 p.
- Estrada E.* Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast // *Proteomics.* 2006. V. 6. № 1. P. 35–40.
- Falcon S., Gentleman R.* Using GOstats to test gene lists for GO term association // *Bioinformatics.* 2006. V. 23. № 2. P. 257–258.
- Findlay A.S., Carter R.N., Starbuck B. et al.* Mouse *Idh3a* mutations cause retinal degeneration and reduced mitochondrial function // *Dis. Model. Mech.* 2018. V. 11. № 12. P. 036426.
- Fujita A., Sato J.Ž.R., de Oliveira Rodrigues L., Ferreira C.E., Sogayar M.C.* Evaluating different methods of microarray data normalization // *BMC Bioinformatics.* 2006. V. 7. № 1. P. 469.
- Gentleman R., Carey V., Huber W., Irizarry R., Dudoit S.* Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer Science & Business Media, 2006. 474 p.
- Jeong H., Mason S.P., Barabási A.-L., Oltvai Z.N.* Lethality and centrality in protein networks // *Nature.* 2001. V. 411. № 6833. P. 41.
- Jheon A.H., Seidel K., Biehs B., Klein O.D.* From molecules to mastication: the development and evolution of teeth // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013. V. 2. № 2. P. 165–182.
- Jia Y., Nie K., Li J., Liang X., Zhang X.* Identification of therapeutic targets for Alzheimer's disease via differentially expressed gene and weighted gene co-expression network analyses // *Molecular Medicine Reports.* 2016. V. 14. № 5. P. 4844–4848.
- Jussila M., Thesleff I.* Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 4. P. a008425.
- Kang J., Bai R., Liu K. et al.* Identification of significantly different modules between permanent and deciduous teeth by network and pathway analyses // *Genet. Mol. Res.* 2016. V. 15. № 4. P. gmr15047959.
- Kettunen P., Loes S., Furmanek T. et al.* Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial *Wnt4* and *Tgfb1* regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme // *Development.* 2005. V. 132. № 2. P. 323–334.
- Langfelder P., Horvath S.* WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis // *BMC Bioinformatics.* 2008. V. 9. № 1. P. 559.
- Lesot H., Brook A.* Epithelial histogenesis during tooth development // *Archives of Oral Biology.* 2009. V. 54. P. S25–S33.
- Li Z., Yu M., Tian W.* An inductive signalling network regulates mammalian tooth morphogenesis with implications for tooth regeneration // *Cell Proliferation.* 2013. V. 46. № 5. P. 501–508.
- Lumsden A.* Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ // *Development.* 1988. V. 103(S). P. 155–169.
- O'Connell D.J., Ho J.W., Mammoto T. et al.* A Wnt-bmp feedback circuit controls intertissue signaling dynamics in tooth organogenesis // *Science Signaling.* 2012. V. 5. № 206. P. ra4–ra4.
- Oldham M.C., Konopka G., Iwamoto K. et al.* Functional organization of the transcriptome in human brain // *Nature Neuroscience.* 2008. V. 11. № 11. P. 1271.
- Peters H., Neubüser A., Kratochwil K., Balling R.* Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities // *Genes & Development.* 1998. V. 12. № 17. P. 2735–2747.
- Plaisier C.L., Horvath S., Huertas-Vazquez A. et al.* A systems genetics approach implicates *USF1*, *FADS3*, and other causal candidate genes for familial combined hy-

- perlipidemia // PLoS Genetics. 2009. V. 5. № 9. P. e1000642.
- Press W., Teukolsky S., Vetterling W., Flannery B. Hierarchical Clustering by Phylogenetic Trees. Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 1235 p.
- Rostampour N. Linking new genes to an odontogenesis TP63-mediated gene regulatory network that is peripheral to jaw morphogenesis: Academic Dissertation. Saskatoon: University of Saskatchewan, 2018. 71 p.
- Satokata I., Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development // Nature Genetics. 1994. V. 6. № 4. P. 348.
- Saxén L., Thesleff I. Epithelial-mesenchymal interactions in murine organogenesis // Ciba Found. Symp. 1992. V. 165. P. 183–193.
- Smoot M.E., Ono K., Ruscheinski J., Wang P.-L., Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization // Bioinformatics. 2010. V. 27. № 3. P. 431–432.
- Szekely G.J., Rizzo M.L. Hierarchical clustering via joint between-within distances: Extending Ward's minimum variance method // J. Classification. 2005. V. 22. № 2. P. 151–183.
- Thesleff I. The genetic basis of normal and abnormal craniofacial development // Acta Odontologica Scandinavica. 1998. V. 56. № 6. P. 321–325.
- Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis // J. Cell. Sci. 2003. V. 116. № 9. P. 1647–1648.
- Troyanskaya O., Cantor M., Sherlock G. et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 6. P. 520–525.
- Tucker A.S., Matthews K.L., Sharpe P.T. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1136–1138.
- Wang L., Cao C., Ma Q. et al. RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: novel and alternative transcripts, evolutionary and functional implications // BMC Plant Biology. 2014. V. 14. № 1. P. 169.
- Yoneda T., Tomofuji T., Kawabata Y. et al. Application of coenzyme Q10 for accelerating soft tissue wound healing after tooth extraction in rats // Nutrients. 2014. V. 6. № 12. P. 5756–5769.

The Mechanism of *Msx1* and *Pax9* Implication in Tooth Development Based on the Weighted Gene Co-Expression Network Analysis

Feng Wang¹, Wen Jiang^{3,4}, Bin Chen^{5,6,7,*}, and Rongrong Li^{2,3,4,**}

¹Department of Stomatology, Dahua Hospital, Xuhui District, Shanghai, 200237 China

²Department of Oral and Maxillofacial Head & Neck Oncology, Division Radiation Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, 200011 China

³National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai, 200011 China

⁴Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai, 200011 China

⁵Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Affiliated to Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, 200011 China

⁶Ear Institute, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, 200011 China

⁷Shanghai Key Laboratory of Translational Medicine on Ear and Nose Diseases, Shanghai, 200011 China

*e-mail: liaochengzhuikao@163.com

**e-mail: chbent@163.com

The mechanism of involvement of *Msx1* and *Pax9* in tooth development in mice was studied. The microarray data GSE32321 which contained the *Msx1* and *Pax9* wildtype and knockout samples from mice oral epithelium (Epi) and dental mesenchymal (Mes) cells were used to identify the differentially expressed genes (DEGs). Then the highest associated gene modules were explored in an Epi-*Msx* group, an Epi-*Pax* group, a Mes-*Msx* group, and a Mes-*Pax* group by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). Gene Ontology (GO) database analysis and hub genes screening were performed on the modules with the highest relevance. A total of 1467, 986, 1212, and 1293 DEGs were identified in Epi-*Msx* group, Epi-*Pax* group, Mes-*Msx* group, and Mes-*Pax* group, respectively. Four highest associated gene modules were identified. GO enrichment analysis showed that these genes were enriched in the following terms: negatively regulated cell proliferation, cell adhesion, blood vessel development and blood vessel morphogenesis involved in tooth development. The hub genes were *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* and *CBLN1*; their gene expression values varied at different time points during tooth development. Moreover, *IDH3A* and *CBLN1* were significantly enriched in oxidoreduction coenzyme metabolic process and cell-cell adhesion terms. *Msx1* and *Pax9* play an important role in tooth development in mice. These genes are probably associated with *IDH3A*, *SSPN*, *F13A1* and *CBLN1*.

Keyword: *Msx1*, *Pax9*, tooth development, WGCNA

УДК 591.3

ОЛЬГА ГЕОРГИЕВНА СТРОЕВА (1925–2021)

DOI: 10.31857/S0475145021030095



5 января 2021 г. на 96-м году ушла из жизни Ольга Георгиевна Строева – доктор биологических наук, профессор, выдающийся ученый, специалист в области биологии развития, создатель научного направления в области сравнительных экспериментальных исследований развития глаза позвоночных. Более 20 лет О.Г. Строева заведовала Лабораторией клеточной дифференцировки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН). Известность в нашей стране и за рубежом Ольге Георгиевне принесли пионерские экспериментальные исследования раннего развития глаза млекопитающих, ретинального пигментного эпителия (РПЭ), изучение морфогенетической роли внутриглазного давления в развитии глаза. По инициативе Ольги Георгиевны и в тесном сотрудничестве с медиками было создано новое офтальмологическое лекарственное средство, внедренное в медицинскую практику.

В 1946 году еще студенткой 3 курса Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова по рекомендации Л.В. Крушинского она начала работать под руководством Г.В. Лопашова в Лаборатории механики развития им. Д.П. Филатова Института цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР (впоследствии ИБР РАН). С лета 1947 по весну 1949 года она выполняла дипломную ра-

боту по теме соотношения развития плавников и тела у личинок амфибий, исследуя роль мезенхимально-эпителиального взаимоотношения в детерминации развивающихся органов в эмбриональном развитии. В 1949 году Ольга Георгиевна защитила дипломную работу и поступила в аспирантуру кафедры эмбриологии биофака МГУ (заведующий кафедрой В.В. Попов), продолжая вести работу на базе Лаборатории механики развития им. Д.П. Филатова под руководством Г.В. Лопашова. В 1951 году она защитила кандидатскую диссертацию “Экспериментальное исследование причинных связей в развитии плавников и конечностей у личинок амфибий”, после чего была зачислена на должность младшего научного сотрудника в Институт морфологии животных АН СССР, из которого впоследствии выделился Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В стенах института Ольга Георгиевна проработала 70 лет.

Под руководством Г.В. Лопашова Ольга Георгиевна участвовала в решении проблемы преодоления трансплантационной несовместимости, а также в разработке методических подходов к изучению механизмов регенерации сетчатки млекопитающих. В этот период происходило совершенствование Ольги Георгиевны как талантливого и изобретательного экспериментатора.

Период совместной работы с Г.В. Лопашовым был отмечен крупными обобщающими публикациями: обзор в *Advances in Morphogenesis* (Lopashov, Stroeva, 1960), статья в *Journal of Embryology and Experimental Morphology* (1960) и монография “Развитие глаза в свете экспериментальных исследований” (Лопашов, Строева, 1963), переведенная в 1964 году в Израиле на английский язык (G.V. Lopashov, O.G. Stroeva. *Development of the eye: experimental studies*. 1964. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem). Результаты исследований были доложены Ольгой Георгиевной на Международной эмбриологической конференции в Париже (1959).

В те же годы Ольга Георгиевна совместно с Л.А. Никитиной и Т.А. Детлаф работала по теме пересадки ядер у бесхвостых амфибий для исследования ядерно-плазменных взаимодействий в развитии. С этой целью в неоплодотворенную энуклеированную яйцеклетку пересаживали ядра клеток на стадии бластулы, разных стадий гастрюлы и ядра соматических клеток. Результаты были представ-

лены на Международной эмбриологической конференции в Хельсинки (1963) и в отечественных и зарубежных публикациях.

В самостоятельных экспериментальных исследованиях Ольгу Георгиевну интересовала проблема трансдифференцировки клеток РПЭ крыс в сетчатку в период эмбрионального развития. С самого ли начала РПЭ детерминирован как таковой, или на ранних стадиях он способен превращаться в сетчатку как у бесхвостых амфибий? Этот вопрос исследовался в условиях культивирования зачатков глаз в органной культуре с использованием в качестве культуральной среды жидкости передней камеры глаза взрослых крыс. Результаты многочисленных экспериментов, проведенных Ольгой Георгиевной по пересадке глазных зачатков на стадиях глазного пузыря и глазного бокала, были обобщены в ее докторской диссертации, защищенной в 1968 году.

В своей работе Ольга Георгиевна впервые показала, что на стадиях эмбрионального развития крыс (до 17-го дня) РПЭ способен претерпевать ретинальную дифференцировку в пределах слоя РПЭ, что дифференцировка радужки и цилиарного тела в краевых зонах глазного бокала зависит от индуцирующего влияния эпителия хрусталика, а сосудистая оболочка — от влияния РПЭ. После 17-го эмбрионального дня превращения РПЭ в сетчатку не происходит. Этот результат оказался важным для объяснения врожденных аномалий глаза человека, таких как типичная и атипичная колобома. В 1971 году по материалам диссертации была опубликована монография “Морфогенез и врожденные аномалии глаза млекопитающих”.

В дальнейшем моделью исследований Ольги Георгиевны стал РПЭ серых крыс (СК) в пре- и постнатальном развитии и эмбрионов птиц, на котором исследовали соотношение процессов пролиферации и меланотической дифференцировки в становлении функций РПЭ. Показано, что у теплокровных животных дифференцировка РПЭ определяется фактором натяжения. Формирование же сосудистой оболочки из окружающей мезенхимы зависит от нормальной дифференцировки РПЭ.

В экспериментах под руководством и при участии Ольги Георгиевны было показано, что у новорожденных СК в РПЭ в результате пролиферативной активности происходит преобразование популяции исходно одноядерных клеток в популяцию двуядерных. К моменту открытия век двуядерные клетки в центральной зоне РПЭ достигают 80%. Двуядерными клетки РПЭ становятся в результате митоза, не завершающегося цитотомией. При этом клетки РПЭ способны совмещать

клеточную пролиферацию и специфическую дифференцировку (меланизацию). Было показано, что степень меланизации клеток РПЭ коррелирует с пиком G₂-фазных клеток (3-и сутки после рождения), когда клетки РПЭ наиболее восприимчивы к меланотропным гормонам, и именно на этот период приходится пик меланотропных гормонов в крови СК. Таким образом, впервые была обоснована зависимость меланотической дифференцировки РПЭ СК от меланотропной активности передней доли гипофиза, которая, в свою очередь, регулируется серотонином. Было также обнаружено, что у крыс РПЭ обладает способностью к фагоцитозу мембранных дисков наружных сегментов фоторецепторных клеток сетчатки задолго до формирования этих сегментов в нормальном развитии.

Работы Ольги Георгиевны пользуются признанием в нашей стране и в мировой науке. В 2003 г. Ольге Георгиевне (совместно с д.б.н. В.И. Миташовым) была присуждена Премия имени А.О. Ковалевского за цикл работ “Исследование механизмов дифференцировки и трансдифференцировки клеток в сравнительном ряду позвоночных”. В 2020 г. Ольге Георгиевне была вручена ведомственная награда Минобрнауки России — почетное звание “Почетный работник науки и высоких технологий Российской Федерации”.

Немалое место в жизни Ольги Георгиевны занимала научно-организационная деятельность. Она была членом редколлегии журналов “Онтогенез” и “Архив анатомии, гистологии и эмбриологии”, организатором и докладчиком ряда научных конференций и школ по биологии развития, читала лекции на кафедре эмбриологии МГУ, в Тбилисском Государственном университете, на кафедре цитологии ЛГУ, в Институте глазных болезней им. Гельмгольца. Ольга Георгиевна являлась составителем или ответственным редактором книг о замечательных ученых школы Николая Константиновича Кольцова — И.А. Рапопорте и Б.Л. Астаурове. Перу Ольги Георгиевны принадлежит более трех сотен научных публикаций, две монографии, а также ряд патентов и изобретений.

Ольга Георгиевна Строева осознавала великую силу нравственных традиций и являла собой образец бескомпромиссного служения интересам науки. Светлая память об Ольге Георгиевне навсегда останется в нашей памяти.

А.В. Васильев, И.С. Захаров,
М.В. Угрюмов, И.Г. Панова
pinag@mail.ru