

Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 53 № 1 2022 ЯНВАРЬ—ФЕВРАЛЬ

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,
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, 2022

© Редакция журнала “Онтогенез”
(составитель), 2022

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 $60 \times 88^{1/8}$
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-131-21 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 53, номер 1, 2022

К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ НИКОЛАЯ КОНСТАНТИНОВИЧА КОЛЬЦОВА

От матричного принципа Н.К. Кольцова к двойной спирали ДНК
Н. Д. Озернюк 3

ОБЗОРЫ

Индукция листовых галлов четырехногими клещами (Eriophyoidea)
как проблема биологии развития
А. Г. Десницкий, Ф. Е. Четвериков 9

Ганглиозиды в развитии организмов, организации прямых межклеточных
взаимодействий, патологии нервной системы, канцерогенезе
В. Я. Бродский 19

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

Изменения окраски редкого глубоководного ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni*
(*Argynchobatidae*, *Rajiformes*, *Chondrichthyes*) в онтогенезе
А. М. Орлов, Н. И. Рабазанов, А. И. Никифоров 31

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Каким образом развитие тонкого кишечника крысы связано с изменениями
в пуле протеасом?
Н. С. Карпов, П. А. Ерохов, Н. П. Шарова, Т. М. Астахова 46

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Влияние линолевой кислоты на эффективность витрификации эмбрионов мышей
Е. Ю. Брусенцев, Т. Н. Игонина, С. В. Окотруб, Э. А. Чуйко, С. Я. Амстиславский 58

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

Происхождение и эволюция нервной системы: новые данные сравнительных
полногеномных исследований многоклеточных животных
В. Е. Дьяконова 63

Contents

Vol. 53, No. 1, 2022

TO THE 150TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF NICHOLAS KONSTANTINOVICH KOLTSOV

From N.K. Koltzov's Principle of the Template to the Double Helix of DNA

N. D. Ozernyuk

3

REVIEWS

Induction of Leaf Galls by Four-Legged Mites (Eriophyoidea)
as a Problem of Developmental Biology

A. G. Desnitskiy and P. E. Chetverikov

9

Gangliosides in Orchestration of Cell-Cell Communication,
Development, Neuronal Pathology and Carcinogenesis

V. Y. Brodsky

19

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

Ontogenetic Changes in Coloration of Rare Deepwater Richardson's Ray

Bathyraja richardsoni (Arhynchobatidae, Rajiformes, Chondrichthyes)

A. M. Orlov, N. I. Rabazanov, and A. I. Nikiforov

31

MOLECULAR BIOLOGY OF DEVELOPMENT

How Is the Development of the Rat Small Intestine Related to Changes
in the Proteasome Pool?

N. S. Karpov, P. A. Erokhov, N. P. Sharova, and T. M. Astakhova

46

BRIEF COMMUNICATIONS

Linoleic Acid Exposure *in vitro* Affects Vitrification of Mouse Embryos

E. Yu. Brusentsev, T. N. Igonina, S. V. Okotrub,

E. A. Chuyko, and S. Ya. Amstislavsky

58

POINT OF VIEW

Origin and Evolution of Nervous System: New Data from Comparative
Whole-Genome Studies of Metazoa

V. E. Dyakonova

63

К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
НИКОЛАЯ КОНСТАНТИНОВИЧА КОЛЬЦОВА

УДК 591,3

ОТ МАТРИЧНОГО ПРИНЦИПА Н.К. КОЛЬЦОВА
К ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

© 2022 г. Н. Д. Озернюк*

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

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

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 20.09.2021 г.

Идея матричного принципа воспроизведения наследственных молекул “Omnis molecula ex molecula” – “Каждая молекула от молекулы” – одно из наиболее значимых научных предсказаний Н.К. Кольцова. Эта идея практически не нашла поддержки и понимания у современников, что связано, вероятно, с бытовавшим тогда представлением о белковой природе наследственных молекул. Последующее развитие молекулярной генетики, открытие ДНК и построение модели двойной спирали ДНК подтвердило матричный принцип воспроизведения наследственных молекул.

Ключевые слова: матричный принцип, репликация, наследственность, ДНК, Кольцов

DOI: 10.31857/S0475145022010062

Выдающийся биолог, основоположник экспериментальной биологии в России – Николай Константинович Кольцов был автором идей и научных предсказаний, преобразивших впоследствии облик мировой науки. Ему принадлежат, в частности, идеи экспериментального получения мутаций (радиационного и химического мутагенеза) и полиплоидных организмов, искусственного партеногенеза и экспериментального воздействия на другие фундаментальные процессы.

Среди идей и предсказаний Н.К. Кольцова матричная гипотеза воспроизведения наследственных молекул занимает особое место. Проблема идентификации, строения и функционирования молекул – носителей наследственности всегда были центральными для биологии. Однако в начале XX века об этих молекулах было известно ничтожно мало. Уже использовался термин “ген”, но неизвестным оставался тип макромолекул – носителей наследственной информации. Кольцов первым в цикле работ предложил оригинальную идею воспроизведения молекул наследственности, в основе которой лежал матричный принцип (Кольцов, 1928а, 1928б, 1929, 1935; Koltsoff, 1928, 1935, 1939). Очевидно эта идея опередила свое время и не нашла понимания у современников, однако последующее развитие мировой науки подтвердило правильность этого предсказания (см. Польшин, 1969; Винберг, 1972; Рапопорт, 1972; Астауров, Рокицкий, 1975; Portugal, Cohen, 1977; Тимофеев-Ресовский, 1993, 2009; Babkov, 2002; Медников, 2005; Озернюк, 2006, 2007, 2012; Мог-

анге, 2011, 2020; Раменский, 2012; Shestakov, Ozernyuk, 2013; Timofeeff-Ressovsky, 2016; Inge-Vechtomov, 2016).

В основе матричной гипотезы лежит сформулированный Н.К. Кольцовым новый принцип: “Каждая молекула от молекулы” – “Omnis molecula ex molecula”, дополнивший уже существующие общепризнанные биологические принципы “Omnis cellula ex cellula” и “Omnis nucleus ex nucleo”, которые вскрывают сущность процессов жизнедеятельности на разных уровнях организации. Идея Кольцова существенно расширила палитру фундаментальных закономерностей процессов жизнедеятельности.

Впервые матричный принцип воспроизведения молекул наследственности был изложен Н.К. Кольцовым в 1927 г. на III-м Всесоюзном совещании зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде в докладе “Физико-химические основы морфологии”. Были сформулированы два краеугольных положения: 1) в качестве матрицы, на которой строится ген будущего поколения, используется ген предыдущего поколения, 2) для начала матричного синтеза необходима затравка. Удивительно, но именно эти идеи впоследствии получили подтверждение. В этой же работе Н.К. Кольцов впервые рассматривает хромосому, состоящую из генов. Однако гипотезу Кольцова участники Совещания в Ленинграде не смогли понять, по-видимому, в силу ее сложности. Более того, И.И. Презент, соратник Т.Д. Лы-

сенко, обвинил докладчика в мистике и увлечении абстракциями.

В 1928 году этот доклад Н.К. Кольцова был опубликован на русском языке в виде краткого, фактически тезисного, автореферата доклада и статьи в Журнале экспериментальной биологии (Кольцов, 1928а, 1928б), а также на немецком языке в журнале “Biologische Zentralblatt” (Koltsoff, 1928), в 1929 г. полный вариант текста доклада вышел в отечественной серии “Новейшие течения научной мысли” (Кольцов, 1929). В соответствии с матричной гипотезой молекулы наследственности имеют белковую природу. В 20-е годы XX века это было естественное предположение, поскольку о нуклеиновых кислотах тогда было известно немного. К 1910 году в составе нуклеиновых кислот были описаны два пуриновых основания (гуанин и аденин) и два пиримидиновых (цитозин и тимин), но описание структуры ДНК произошло десятилетиями позже (Watson, Crick, 1953; Portugal, Cohen, 1977). В 1920 году была сформулирована новая теория полимеров, за которую впоследствии, в 1953 году, Г. Штаудингер получил Нобелевскую премию (Staudinger, 1920). Эта теория была активно воспринята Н.К. Кольцовым. По мнению Э. Майра (Maug, 1982), именно понимание того, что наследственная молекула должна иметь полимерную структуру, оказалось решающим для дальнейшего развития концепции Н.К. Кольцова. Понимая сложность данной проблемы, Кольцов писал, что предлагаемая им гипотеза в своей химической части далека от завершения, более того — еще весьма спорна (Кольцов, 1936). Идея о белковой природе гена на протяжении примерно 20 лет оставалась доминирующей. В числе приверженцев этой идеи Н.К. Кольцов упоминает авторов книги “Строение высокомолекулярных органических естественных соединений” К. Майера и Г. Марка (Meuer, Mark, 1930), а также известного английского химика В. Астбери (Astbury, 1933). Эти авторы ссылаются на работы Кольцова, посвященные матричной гипотезе и белковой природе наследственных молекул. Следует отметить, что известный американский генетик М. Демерес (Demerces, 1933, 1938) считал, что роль наследственных молекул выполняет ДНК. Однако в ту пору такие суждения не были доминирующими.

В 1934 г. статья Н.К. Кольцова, посвященная матричному принципу на модели *Drosophila*, в сокращенном виде была опубликована в журнале Science (Koltzoff, 1934). В этой статье он пишет: “Каждая хромосома представляет сложное образование, наиболее существенной частью которого является продольная нить, состоящая из ряда генов. Я назвал ее поэтому геномой” (перевод автора). Далее Кольцов отмечает, что в хромосоме находится множество генов, и они, будучи сцеплены между собой, передаются из поколения в поколение.

Почему идея Н.К. Кольцова о матричном принципе не была известна за пределами России? М. Моранж (Morange, 2011) — французский исследователь, специалист в области молекулярной биологии и истории науки считает основной причиной отсутствие публикаций в англоязычной научной литературе.

Известно, что после публикаций доклада “Физико-химические основы морфологии” на немецком (Koltsoff, 1928) и русском языках (Кольцов, 1928, 1929), основные идеи матричного принципа в развернутом виде Николай Константинович опубликовал впоследствии в двух статьях на русском языке: “Наследственные молекулы” (Кольцов, 1935) и “Роль гена в физиологии развития” (Кольцов, 1935). Эти две работы были изданы на французском языке в престижной серии Эрманна (Hermann), в которой публиковались труды Альберта Эйнштейна, Норберта Винера, Пьера Кюри, Луи де Бройля, Жака Моно и других авторов. В данной серии под общим названием “Генетика и проблемы эволюции” работы Н.К. Кольцова были изданы в виде двух небольших книг: “Physiologie du de'veloppement et genetique”, Paris, 1935; и “Les mole'cules hereditaires”, Paris, 1939 (Koltzoff, 1935, 1939). Однако эти книги остались незамеченными. Причиной тому было, как считает Моранж, отсутствие англоязычной версии этих работ (“These two books... were published in French, and not translated into English”) (Morange, 2011). Моранж пишет: “Обе книги [Н.К. Кольцова] содержат ключи к представлениям биологов в 1930-е годы, а также гипотезам, моделям и наблюдениям, из которых в последующем вырастет молекулярная биология. Они дают представление о самом Кольцове, о его идеях и вкладе в науку, а также показывают политическую обстановку, в которой он работал” (Morange, 2011). К этому времени исследования химиков-органиков подтвердили возможность существования гигантских молекул, что укрепило гипотезу Н.К. Кольцова о гемонеме (Кольцов, 1935, 1936; Koltsoff, 1939). В работе 1935 года Кольцов подробно рассказывает о том, что он подразумевает под принципом молекула от молекулы, т.е. тем принципом, который получил название матричного, описывает его как процесс роста кристаллов при наличии кристаллической решетки. И здесь же он указывает на то, что ему “... было очень приятно шесть лет спустя после того, как эта гипотеза была мной опубликована в немецком биологическом журнале, найти в работе немецкого химика Штаудингера ту же идею, повторенную в тех же выражениях” (цит. по: Николай Константинович Кольцов..., 2021, стр. 140).

Все же нельзя утверждать, что работы Кольцова не были известны, скорее, они мало цитировались в 1920–40-е годы. Но то, как и кем они цитировались, свидетельствует о сильном эффекте идей Н.К. Кольцова. Например, Д.М. Ринч в

сноске (Wrinch, 1936, p. 560) к своим рассуждениям о молекулярной природе (нуклеиновые кислоты или белки) мицеллярного строения хромосомом, пишет, что было бы интересно сравнить полученные ею заключения с теми, что высказал Н.К. Кольцов (Koltsoff, 1928), (см. Wrinch, 1936, p. 560: “It is interesting to compare our conclusions with those expressed by N. Koltzoff in his paper *Biologisches Zentralblatt*, 1928, 48, 345–369”]. Позже Уоддингтон (Waddington, 1969) в обзорной статье в *Nature*, посвященной исследователям из Европы, внесшим вклад в предысторию молекулярной биологии, пишет о концепции гемонемы, ссылаясь именно на Н.К. Кольцова (Koltzoff, 1939) и Ринч (Wrinch, 1936) (Waddington, 1969). Эрнст Майр в книге “Рост биологической мысли” (*The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*) (Mayr, 1982) подробно рассматривая историю развития теории гена и химической природы наследственности, делает акцент на гипотезе Н.К. Кольцова. Э. Майр отдает дань уважения и российской школе генетики в целом, как и Р. Гольдшмидт, известнейший эволюционный биолог XX века, друживший с Н.К. Кольцовым со студенческих лет (см. Гольдшмидт, 2021). Крупнейшие эволюционные биологи, такие как Р. Гольдшмидт (Goldschmidt, 1938, 1958) и С. Райт (Wright, 1938) неоднократно цитируют работы Н.К. Кольцова.

Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский был последовательным проводником идеи матричного принципа Кольцова. С 1925 по 1945 г. Н.В. Тимофеев-Ресовский был прикомандирован по рекомендации Н. К. Кольцова, в Берлин-Бух в Институт исследований мозга при Обществе содействия наукам им. Кайзера Вильгельма, которым руководил известный врач и нейроанатом Отто Фогт, участвовавший в лечении В.И. Ленина, а позднее в исследовании его мозга. Эта командировка круто изменила судьбу Тимофеева-Ресовского. Приехав в Германию в возрасте 25 лет, он стал впоследствии признанным специалистом в области генетики и радиобиологии (Rokityanskij, 2005; Levit, Hossfeld, 2009; Rajewsky et al., 2016). Исследования природы мутаций, в том числе радиационного мутагенеза, проводились Тимофеевым-Ресовским в созданном им отделе генетики и биофизики в Институте исследований мозга. Эти работы были в определенной степени продолжением идеи Кольцова о матричном принципе, который стали называть “конвариантной редупликацией наследственных молекул” (Timofeeff-Ressovsky, 2016; Inge-Vechtomov, 2016).

Э. Шредингер, автор невероятно популярной книги “Что такое жизнь с точки зрения физики?” (Schrödinger, 1944, перевод: Шредингер, 1947), связывал появление понятия “наследственных молекул” с именем Макса Дельбрюка. Известно, что в 1930-е годы Дельбрюк часто обсуждал стро-

ение генов и хромосом с Н.В. Тимофеевым-Ресовским (Тимофеев-Ресовский, 2009; Rajewsky et al., 2016; Timofeeff-Ressovsky, 2016). В период работы в Берлин-Бухе Николай Владимирович вошел в знаменитый “Круг Бора” – небольшую группу известных ученых, которые собирались обычно в Копенгагене у Нильса Бора два-три раза в год для обсуждения физических и биологических проблем. Николай Владимирович активно сотрудничал с крупными учеными всего мира по проблемам генетики и радиобиологии. В 1935 г. в “Вестнике Геттингенской Академии наук” была опубликована знаменитая работа Н.В. Тимофеева-Ресовского, К.Г. Циммера и М. Дельбрюка “О природе генных мутаций и структура гена”, которую впоследствии стали называть “Зеленой тетрадой” (по цвету обложки) или TZD (по фамилиям авторов) (Timofeeff-Ressovsky et al., 1935; Timofeeff-Ressovsky, 2016). В этой работе мутагенез, вызванный X-лучами, обсуждался, в частности, в контексте “генных молекул”. В увлечении Тимофеева-Ресовского этой проблемой и использовании радиационного мутагенеза в качестве метода прослеживаются идеи Н.К. Кольцова. Интересно, что в этой статье три подраздела, каждый из них написан одним автором, и в третьем разделе, написанном М. Дельбрюком, полимерная природа генов еще подвергается сомнению: “Мы оставляем открытым вопрос о том, является ли индивидуальный ген полимерной структурой, образованной повторением идентичных атомных структур, или же он не проявляет такой периодичности” (Timofeeff-Ressovsky et al., 1935, p. 226, перевод автора).

После выхода в свет “Зеленой тетрады” были организованы международные семинары по генетике, которые поддерживались Рокфеллеровским Фондом. Участниками этих семинаров были Г. Меллер, Дж. Холдейн, М. Дельбрюк, С.Д. Дарлингтон, Р. Фишер, Н.В. Тимофеев-Ресовский, Б. Эфрусси (один из учеников Н.К. Кольцова, уехавших во Францию) (Timofeeff-Ressovsky, 2016). В 1938 г. на одном из таких семинаров, который проходил в г. Спа (Бельгия), вступительные доклады сделали Г. Меллер и Н.В. Тимофеев-Ресовский. Основной темой этой встречи было обсуждение строения гена и конвариантная редупликация наследственных молекул. Трудно представить, что участники этого семинара не слышали от Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского о матричной гипотезе Н.К. Кольцова, столь близкой к обсуждаемой тематике.

К началу 1940-х годов все острее вставал вопрос о природе молекул наследственности. В связи с возрастающим интересом к этой проблеме многие исследователи стали изучать механизмы размножения бактериофагов. Ряд ученых объединились в так называемую “фаговую группу”, которую возглавляли С. Луриа и М. Дельбрюк. В 1944 г. в этой области было сделано выдающееся

открытие. Д. Эвери, О. МакЛеод и М. МакКарти, изучавшие размножение бактериофагов и природу трансформирующего фактора, показали, что при трансформации роль генетического материала выполняет ДНК (Avery et al., 1944). Заражение бактерии происходит за счет проникновения фаговой ДНК. Это открытие принципиально изменило взгляды на природу генетического материала: у исследователей появилась доказательство того, что молекулой наследственности является ДНК.

Изучением структуры ДНК заинтересовались физики, химики, кристаллографы. Два года интенсивных рентгеноструктурных исследований ДНК в Англии и неоднократных попыток построить пространственную модель этой молекулы привели Ф. Крика к идее саморепликации генов. Эта идея – подтверждение матричной гипотезы Н.К. Кольцова. Дж. Уотсон в 1968 г. писал: “В кругах генетиков теоретического склада, заинтересованных проблемой удвоения гена, она [гипотеза саморепликации] циркулировала уже лет тридцать. Суть ее состояла в том, что для удвоения гена требуется образование комплементарной (негативной) копии, форма которой соотносится с исходной (позитивной) поверхностью, как ключ с замком. Комплементарная (негативная) копия будет служить в качестве матрицы для синтеза новой (позитивной) копии” (Watson, 1968).

В итоге Френсис Крик, Джеймс Уотсон, Розалинд Франклин, Морис Уилкинс, Раймонд Голдинг и Лайнус Полинг (построивший промежуточный вариант тройной спирали ДНК), при поддержке Лоуренса Брега, Эрвина Чаргаффа и Макса Перутца в течение трех лет (невероятно короткий срок) смогли пройти этот очень длинный путь, который условно можно разделить на несколько этапов (см. Fuller, 2003; Klug, 2004): а) получение первых дифракционных картин ДНК, которые указывали на кристаллическое состояние этих молекул (1950 г., Р. Гослинг и М. Уилкинс); б) первый рентгеноструктурный анализ ДНК, свидетельствующий о спиральной структуре этих молекул, которые формируют спираль: двойную или тройную (1951 г., Р. Франклин); в) построение первой модели ДНК – тройной спирали (1952 г., Л. Полинг); г) доказательства комплементарности пуриновых и пиримидиновых оснований в спирали ДНК на основе известных ранее правил Э. Чаргаффа (1952 г., Э. Чаргафф, Ф. Крик и Д. Уотсон); д) получение дифракционной картины одной из форм ДНК (В-формы), которая легла в основу окончательной модели этой молекулы (1952, 1953 гг., Р. Франклин); е) построение окончательного варианта модели двойной спирали ДНК (февраль 1953 г., Д. Уотсон, Ф. Крик).

Конечно, путь от высказанной впервые идеи матричного принципа Н.К. Кольцова до построения модели двойной спирали ДНК длиной 25 лет не

был простым, но захватывающе интересным. После открытия двойной спирали в 1953 г., в области изучения ДНК происходило много событий, радикально меняющих наши представления о границах возможного или допустимого вмешательства в геном. Это, в частности, обнаружение мобильных элементов в геноме, сайт-специфический мутагенез, секвенирование геномов сотен организмов, редактирование генома, перспективы генотерапии и многое другое. Существенно, что “картина мира”, полученная при изучении генома, дополняется и усложняется эпигенетическими механизмами регуляции онтогенеза и процессов жизнедеятельности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках выполнения Государственного задания № 0088-2021-0009.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Астауров Б.Л., Рокицкий П.Ф.* Николай Константинович Кольцов. 1972–1940. М.: Наука, 168 с.
- Бабков В.В.* Московская школа эволюционной генетики. М.: Наука, 1985. 215 с.
- Бабков В.В.* О жизни и творчестве Николая Константиновича Кольцова / Н.К. Кольцов. Избранные труды. М.: Наука, 2006. С. 203–241.
- Винберг Г.Г.* Кольцовское начало // Химия и жизнь. 1972. № 7. С. 31–34.
- Гольдшмидт Р.* Встреча с Россией / В кн.: Николай Константинович Кольцов. Очерки, статьи, письма, документы. М.: Научный мир. 2021. С. 314–319.
- Кольцов Н.К.* Физико–химические основы морфологии // Журн. экспериментальной биологии. Сер. Б. 1928. Т. 7. Вып. 1. С. 3–31.
- Кольцов Н.К.* Физико–химические основы морфологии. Автореферат доклада / В кн.: Труды III Всероссийского съезда зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде 14–20 декабря 1927 г. Л.: Сомов, 1928. С. 39–41.
- Кольцов Н.К.* Физико–химические основы морфологии. Речь на первом торжественном собрании III Всесоюзного съезда зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде 14 дек. 1927 г. М.-Л.: Госиздат, 1929. 58 с.
- Кольцов Н.К.* Наследственные молекулы. Наука и жизнь. 1935. № 5. С. 4–14. Переиздание в кн.: Николай Константинович Кольцов. Очерки, статьи, письма, документы. М.: Научный мир, 2021. С. 110–142.
- Кольцов Н.К.* Роль гена в физиологии развития. Биол. журнал. 1935. Т. IV. Вып. 5. с. 753–774. Переиздание в кн.: Николай Константинович Кольцов. Очерки,

- статьи, письма, документы. М.: Научный мир, 2021. С. 168–191.
- Кольцов Н.К. Организация клетки. Сборник экспериментальных исследований, статей и речей. М.-Л.: Биомедгиз, 1936. 562 с.
- Кольцов Н.К. Избранные труды. М.: Наука, 2006. 295 с.
- Медников Б.М. Избранные труды. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 366 с.
- Озернюк Н.Д. Предисловие / Н.К. Кольцов. Избранные труды. М.: Наука, С. 5–10.
- Озернюк Н.Д. Одна история двух институтов // Природа. 2007. № 10. С. 4–8.
- Озернюк Н.Д. Научная школа Н.К. Кольцова. Ученики и соратники. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. 357 с.
- Польнин В.М. Пророк в своем отечестве. М.: Сов. Россия, 1969. 126 с.
- Раменский Е.В. Николай Кольцов. Биолог, обогнавший время. М.: Наука, 2012. 387 с.
- Рапопорт И.А. Кольцов, каким я его помню // Химия и жизнь. 1972. № 7. С. 34–38.
- Тимофеев-Ресовский Н.В. Очерки, воспоминания, материалы. М.: Наука, 1993. 395 с.
- Тимофеев-Ресовский Н.В. Избранные труды / Отв. ред. Газенко О.Г., Иванов В.И. М.: Наука, 2009. 511 с.
- Astbury W.T. Fundamentals of fibre structure. Oxford University Press, London, 1933. 135 p.
- Avery D.T., MacLeod O.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substrate inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III // J. Exp. Med. 1944. V. 79. P. 137–158.
- Babkov V.V. The Theoretical-biological concept of Nikolai K. Kol'tsov // Russian Journal of Developmental Biology. 2002. V. 33(4). P. 255–262.
- Demerec M. Heredity effect of X-ray radiation // Radiation. 1938. V. 30. P. 212–220.
<https://doi.org/10.1148/30.2.212>
- Demerec M. What is a gene? // J. Hered. 1933. V. 24. P. 369–378.
- Fuller W. Who said “helix”? // Nature. 2003. V. 424(6951). P. 876–878.
- Goldschmidt R. Physiological Genetics. McGraw–Hill Publishing Co, Ltd., London, 1938. 375 p.
- Goldschmidt R.B. Theoretical Genetics. University of California Press, Berkeley; Los Angeles, 1958. 563 p.
- Inge-Vechtomov S.G. Template Principle in Biology / Eds. Korogodina V., Mothersill C., Inge-Vechtomov S., Seymour C. Genetics, Evolution and Radiation. 2016. P. 41–54.
- Klug A. The discovery of the DNA double helix // J. Mol. Biol. 2004. V. 335. P. 3–26.
- Koltzoff N. Physikalisch–chemische Grundlagen der morphologie // Biologisches Zentralblatt. 1928. Bd. 48. H. 6. S. 345–369.
- Koltzoff N. The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila* // Science. 1934. V. 80. № 2075. P. 312–313.
- Koltzoff N.K. Les molécules héréditaires / Exposés de biologie, de génétique: la génétique et les problèmes de l'évolution. 1939. Actualités scientifiques et industrielles. № 776. Paris: Hermann. 60 p.
- Levit G.S., Hossfeld U. From molecules to the biosphere: Nikolai V. Timoféeff-Ressovsky's (1900–1981) research program within a totalitarian landscape // Theory Biosci. 2009. V. 128. P. 237–248.
- Mayr E. The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance. Harvard University Press, 1982. 974 p.
- Meyer K.H., Mark H. Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1930. 264 p.
- Morange M. The attempt of Nikolai Koltzoff (Koltsov) to link genetics, embryology and physical chemistry // Journal of Biosciences. 2011. V. 36(2). P. 211–214.
- Morange M. The Black Box of Biology. Harvard University Press, 2020. 503 p.
- Portugal F.H., Cohen J.S. A Century of DNA. Cambridge: M.I.T. Press, 1977. 398 p.
- Rajewsky M., Lafuente D., Bader M. Timoféeff-Ressovsky in Berlin–Buch (1925–1945) / Eds. Korogodina V., Mothersill C., Inge-Vechtomov S., Seymour C. Genetics, Evolution and Radiation. 2016. P. 13–28.
- Rokityanskij Y.G. N.V. Timofeef-Ressovsky in Germany (July, 1925–September, 1945) // J. Biosciences. 2005. V. 30(5). P. 573–580.
- Schrödinger E. What Is Life? Cambridge: Cambridge University Press. 1944. 194 p. перевод: Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? М.: Госинлитиздат, 1947. 146 с.
- Shestakov S.V., Ozernyuk N.D. Nikolai Konstantinovich Kol'tsov: The father of the Russian school of experimental biology (to the 140th anniversary) // Russian J. Genetics. 2013. V. 49(1). P. 1–3.
- Staudinger H. 1920. Über Polymerisation. Ber. Dtsch. Chem. Ges. V. 53. P. 1073–1085. цит. по англ. переводу Holger Frey H., Johann T. Celebrating 100 years of “polymer science”: Hermann Staudinger's 1920 manifesto // Polym. Chem. Polym. Chem. 2020. V. 11. P. 8–14.
<https://doi.org/10.1039/C9PY90161B>
- Timofeef-Ressovsky N.W. Some Stories Told by N.W. Timofeef-Ressovsky / Eds. Korogodina V., Mothersill C., Inge-Vechtomov S., Seymour C. Genetics, Evolution and Radiation. 2016. P. 3–12.
- Timofeef-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbrück M. Über die Natur der Genmutation und Genstruktur // Nachrichten von der Gesellschaft Wissenschaften zu Göttingen: Mathematische–Physikalische Klasse, Fachgruppe VI, Biologie. Bd. 1. 1935. № 13. P. 189–245.
- Watson J.D. The Double Helix. Atheneum: N.Y. 1968. 226 p.
- Watson J.D., Crick F.H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. V. 171(4356). P. 737–738.
- Wright S. The physiology of the gene // Physiological Reviews. 1941. V. 21(3). P. 487–527.
- Wrinch D.M. On the molecular structure of chromosomes // Protoplasma. 1936. V. 25(1). P. 550–569.

From N.K. Koltzov's Principle of the Template to the Double Helix of DNA

N. D. Ozernyuk*

Koltzov Institute of Developmental Biology, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

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

The idea of the template principle for the hereditary molecules replication “*Omnis molecula ex molecula*”, is one of the most significant predictions of N.K. Koltzov. This idea was practically not supported and understood by his contemporaries, probably due to an idea about the protein nature of hereditary molecules that existed at the time. The development of molecular genetics, discovery of DNA, and construction of the DNA double helix model confirmed the template principle of hereditary molecules replication.

Keywords: template replication, heredity, DNA, Koltzov

УДК 591,3

ИНДУКЦИЯ ЛИСТОВЫХ ГАЛЛОВ ЧЕТЫРЕХНОГИМИ КЛЕЩАМИ (ERIOPHYOIDEA) КАК ПРОБЛЕМА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

© 2022 г. А. Г. Десницкий^а, *, Ф. Е. Четвериков^б, **^аСанкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии, Университетская набережная, 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия^бЗоологический институт РАН, Университетская набережная, 1, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: adesnitskiy@mail.ru

**e-mail: philipp-chetverikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 19.09.2021 г.

Принята к публикации 25.09.2021 г.

В статье рассмотрены публикации последних лет по формированию галлов на листьях цветковых растений, зараженных четырехногими клещами (Acariformes, Eriophyoidea). Используются литературные данные по нескольким парам паразит–хозяин, поскольку нет универсальной модельной системы для экспериментального анализа этой проблемы. Галлогенез представляет собой сложную ростовую реакцию, которая происходит в тканях листа под воздействием слюны клеща. Рассмотрены данные о возможности передачи фитогормонов и симбиотических микроорганизмов от паразитов к галлообразующим растениям, однако важный вопрос о природе агентов, индуцирующих клещевые галлы, пока остается открытым. В последние годы достигнуты успехи в изучении экспрессии генов в ходе развития галлов на листьях земляники. Для клещевых галлов характерно присутствие питательной ткани, и представляют интерес сравнительно-цитологические и молекулярно-генетические исследования ее развития и дифференцировки. Необходимо также анализ роли и динамики изменений клеточной пролиферации в ходе галлогенеза, поскольку широко распространенные представления об активации клеточных делений на ранних этапах формирования галлов базируются лишь на качественной оценке, без количественного учета делящихся клеток.

Ключевые слова: галлогенез, дифференцировка клеток, индуцирующий стимул, питательная ткань, пролиферация клеток, паразитизм

DOI: 10.31857/S0475145022010037

ВВЕДЕНИЕ

Растительные галлы — это специализированные структуры, появляющиеся на растениях в ответ на воздействия различных паразитов, таких как растительноядные насекомые, клещи и нематоды, вирусы, бактерии, грибы (Sinnott, 1960; Raman, 2011; Chetverikov et al., 2015; de Lillo et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Harris, Pitzschke, 2020 и др.). Анализом галлов занимаются многие исследователи, но чаще всего ботаники, зоологи, энтомологи, паразитологи и экологи. Несмотря на наличие обширной литературы по процессу галлогенеза, он редко привлекает внимание специалистов по биологии развития. Между тем индуцированные животными галлы (синоним: зооцецидии) “имеют постоянную и характерную форму, размер и строение и им присуща довольно значительная гистологическая дифференцировка... В большинстве случаев для них характерен какой-то определенный период развития, или жизненный цикл, связанный с циклом развития паразита” (Sinnott, 1960, p. 283).

В настоящем обзоре предпринята попытка рассмотреть индукцию клещевого галлогенеза как проблему биологии развития. Для этого мы, в частности, привлекаем некоторые классические публикации по исследованию межклеточных взаимодействий в онтогенезе животных (Toivonen et al., 1976; De Robertis, Kuroda, 2004), поскольку наибольшие успехи в изучении индукционных процессов были достигнуты именно в области экспериментальной эмбриологии животных. Это касается таких аспектов, как генетический контроль эмбриональной индукции, идентификация индуцирующих молекул и способы передачи индуцирующих стимулов. Разумеется, процессы клеточной дифференцировки и морфогенеза у высших растений имеют свою специфику. Тем не менее, при взаимодействии растений и паразитических членистоногих стимулы, модифицирующие программу развития растения–хозяина и индуцирующие галлогенез, исходят от организма животного.

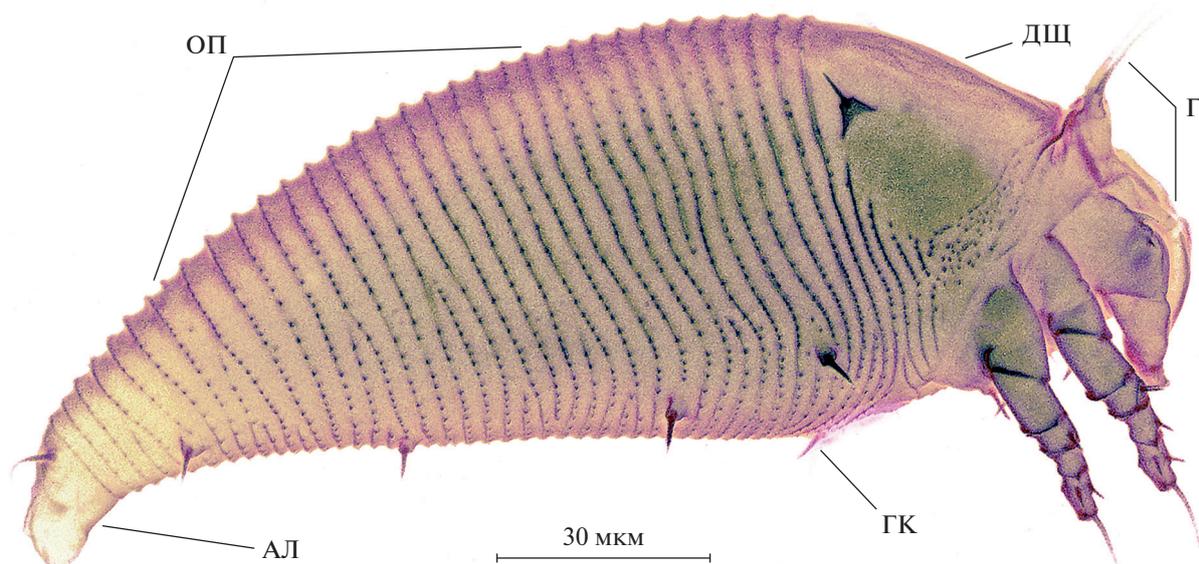


Рис. 1. Строение галловых клещей на примере самки *Phyllocoptes bilobospinosus* (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия). Обозначения: АЛ – анальная лопасть, Г – гнатосома (игловидные хелицеры вывернуты вверх), ГК – генитальная крышка, ДШ – дорзальный щиток, ОП – опистосома, покрытая кольцевидными кутикулярными складками (по: Chetverikov et al., 2019).

Галлы могут образовываться на самых разных частях растения, однако мы ограничиваемся в этой статье рассмотрением публикаций по клещевым галлам, индуцированным только на листьях. Традиционно чаще изучали листовые галлы, развивающиеся на растениях, зараженных насекомыми. Однако нередко в обзорных статьях по этой теме (например, Raman, 2011, 2021; Fernandes et al., 2012; Gätjens-Boniche, 2019; Miller, Raman, 2019) авторы рассматривают в одном контексте данные по галлам, индуцированным не только насекомыми, но и четырехногими клещами (вредоносными видами с высокой экономической значимостью). Поэтому в отличие от упомянутых обзоров, в которых клещевым галлам уделялось минимальное внимание, мы обсуждаем преимущественно литературу по галлогенезу на листьях, зараженных четырехногими клещами, но при этом также используем некоторые важные данные последних лет по развитию галлов, индуцированных насекомыми. С другой стороны, в обзорах по взаимодействиям растений с четырехногими клещами (Petanović, Kielkiewicz, 2010a, 2010b; Chetverikov et al., 2015; de Lillo et al., 2018) авторы стремились охватить все аспекты клещевого галлогенеза и возможно по этой причине почти не использовали литературу по галлообразующим насекомым.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕТЫРЕХНОГИХ КЛЕЩЕЙ

Галловые клещи, или эриофиоидеи (Acari-formes: Eriophyoidea) – aberrantная группа мик-

роскопических акариформных клещей (рис. 1). Они имеют вытянутое червеобразное тело, покрытое кольцевыми складками, колюще-сосущий ротовой аппарат и только две пары ходильных конечностей, поэтому их часто называют “четыреногими” (four-legged mites). Эти особенности строения эриофиоидей связывают с адаптацией к фитопаразитизму и миниатюризацией (Nuzzaci, Alberti, 1996). Размеры эриофиоидей в среднем находятся в пределах от 200 до 300 мкм, а мельчайшие представители не превышают 90 мкм в длину (Polilov, 2015). Несмотря на свои микроскопические размеры четырехногие клещи играют важную роль в экосистемах, внося существенный вклад в регуляцию количественного и качественного (структурного) состава фитоценозов благодаря способности эриофиоидей вызывать угнетение роста растений, а также индуцировать галлогенез (Сухарева, 1992; de Lillo et al., 2018). Последние работы по филогении Acari-formes (Bolton et al., 2017, 2018; Klimov et al., 2018), показали, что эриофиоидеи имеют общих предков с древней группой почвенных червеобразных клещей-нематалицид (Nematalycidae) и, вероятно, перешли к фитофагии через промежуточную связь с микоризой высших растений.

В настоящее время известно порядка 5000 видов галловых клещей, но предполагают, что большая часть мирового разнообразия эриофиоидей до сих пор не описана, а общее число видов оценивается примерно в 50000 (Amrine et al., 2003). Однако лишь примерно 500 видов (около 10% от общего числа) индуцируют формирование галлов, тогда как другие виды эриофиоидей такой способ-

ностью не обладают и часто живут на растениях открыто (Michalska et al., 2010; Chetverikov et al., 2015; de Lillo et al., 2018). Клещи способны образовывать галлы на всех наземных не покрытых корой частях растений, но наиболее часто поражают листья. Хотя попытки классифицировать различные типы листовых галлов предпринимались многократно (Nalepa, 1929; Keifer, 1975; Westphal, 1992; Westphal, Manson, 1996; Chetverikov et al., 2015), на данный момент нет единой принятой всеми специалистами классификации. В качестве основных классификационных критериев обычно рассматривают такие признаки галлов как их внешний вид и форма, цвет и локализация на растении. Поскольку для многих галлов эриофиоидных клещей характерно наличие разнообразных трихом, формирующихся под воздействием слюнных клещей в галле, то часто для различения типов галлов используют форму трихом (волосовидные, головчатые, булавовидные и др.). На листьях древесных растений клещи вызывают следующие основные типы галлов (рис. 2): мешковидные и рожковидные галлы, войлочки (незамкнутые галлы, характеризующиеся формированием области листа, плотно покрытой трихомами, своеобразный “трихомный коврик”), закручивания края листа, жилковые галлы, а также паренхиматозные галлы (в этом случае клещи внедряются под эпидерму и вызывают некротические изменения паренхимы).

Уместно отметить, что во включающем свыше миллиона видов классе насекомых (Insecta) насчитывается по данным разных авторов от 13 до 211 тысяч галлообразующих видов (Stone, Schönrogge, 2003; Hardy, Cook, 2010; Takeda et al., 2021). Такие насекомые встречаются в шести отрядах, причем чаще всего в отряде Diptera (в семействе Cecidomyiidae) и в отряде Hymenoptera (в семействе Сynipidae). Способность индуцировать галлогенез возникла в классе насекомых многократно и независимо (Hardy, Cook, 2010; Miller, Raman, 2019; de Araújo et al., 2019; Takeda et al., 2021), так же, как и в разных филогенетических линиях галловых клещей (Chetverikov et al., 2021).

КРАТОЕ ОПИСАНИЕ ГАЛЛОГЕНЕЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ЧЕТЫРЕХНОГИМИ КЛЕЩАМИ НА ЛИСТЯХ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Нет универсальной модельной системы для анализа клещевого галлогенеза на листьях. Разные авторы изучали разные пары паразит—хозяин из разных климатических зон земного шара: умеренный климат (Kendall, 1930; Kane et al., 1997), субтропики (de Lillo et al., 2020), тропики (Moura et al., 2009).

Относительно подробно описан галлогенез, индуцированный клещом *Eriophyes laevis* Nalepa

на двух видах европейской ольхи *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. и *Alnus incana* (L.) Moench. (Betulaceae) (Kane et al., 1997), а также клещом *Aceria lantanae* Cook на неотропическом вечнозеленом кустарнике *Lantana camara* L. (Verbenaceae) (Moura et al., 2009). В обоих случаях начальные этапы галлогенеза сопряжены с активными клеточными делениями в эпидерме и паренхиме листа. На абаксиальной стороне листовой пластинки происходит инвагинация и в результате формируется мешковидный галл (Kane et al., 1997). Галловая камера, в которой происходит размножение и развитие клещей, выстлана питательной тканью, служащей прямым источником пищи для паразитов (Moura et al., 2009). Однако необходимо отметить, что в упомянутых статьях (как, впрочем, и в работах по анализу галлогенеза, индуцированного насекомыми) не производили количественного учета делящихся клеток при формировании листовых галлов. Поэтому, к сожалению, в настоящее время еще ничего нельзя сказать о продолжительности клеточных циклов (а возможно также и о динамике их изменений) в ходе развития листовых галлов, индуцированных эриофиоидными клещами.

Около 50 лет тому назад на нескольких системах для изучения клещевого галлогенеза была показана полиплоидизация ядер клеток питательной ткани в листовых галлах растений-хозяев (растения родов *Alnus*, *Campanula*, *Prunus*, *Ulmus* и др.; клещи родов *Aceria*, *Eriophyes*, *Phytoptus*) (Hesse, 1968, 1971a; Westphal, 1974). Одновременно с этим полиплоидные ядра были обнаружены также в клетках питательной ткани листовых галлов, индуцированных насекомыми (Hesse, 1968, 1971b, 1972). Однако из 60 изученных в работах М. Гессе пар “цветковое растение—паразитическое членистоногое” полиплоидные ядра в клетках галлов были четко выявлены только в случае 26 пар. В 25 парах результат был однозначно отрицательным, а в 9 парах — предположительно отрицательным (Hesse, 1968). К сожалению, в последующие годы перспектива дальнейшего изучения полиплоидии у клеток галлов, индуцируемых клещами или насекомыми, не привлекала внимание исследователей.

Наиболее обстоятельным анализом клещевого галлогенеза до сих пор остается многолетняя серия исследований, проведенных во Франции Е. Вестфаль и ее коллегами (Westphal et al., 1981, 1990; Westphal, 1982, 1983, 1992; Bronner et al., 1989; Westphal, Manson, 1996 и др.). Эти авторы культивировали многолетний полукустарник паслен сладко-горький *Solanum dulcamara* L. (Solanaceae) в условиях лаборатории или оранжереи и заражали растения эриофиоидным клещом *Aceria cladophthirus* Nalepa. Экспериментальное исследование с использованием 240 молодых растений паслена, каждое из которых было в возрасте 3—4 недель заражено 20—50 галловыми клещами,

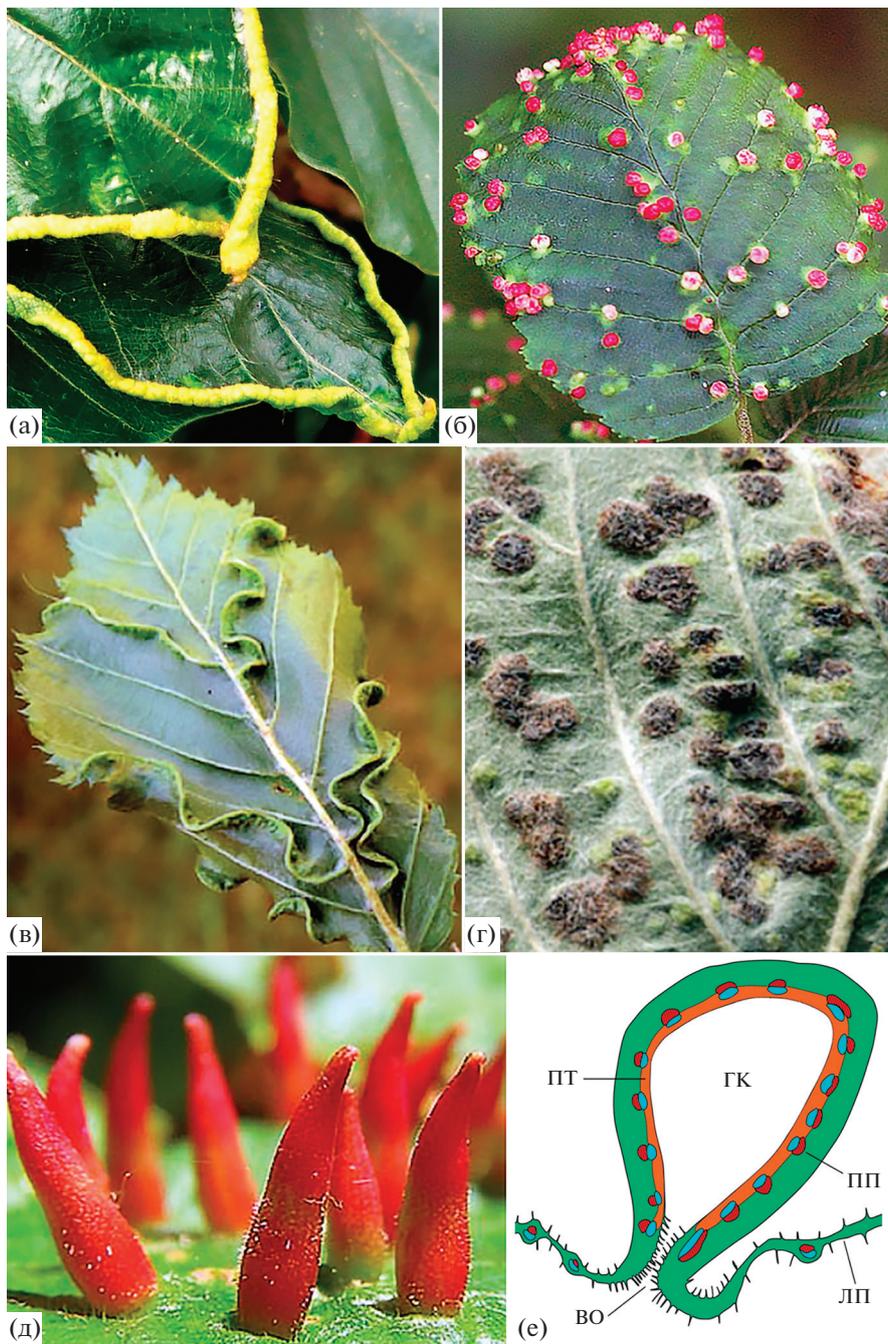


Рис. 2. Некоторые распространенные типы листовых галлов, вызываемые эриофиоидными клещами. (а) – закручивание края листа на буке *Fagus sylvatica*, вызываемое клещом *Acalitus stenaspis* Nalepa; (б) – мешковидные галлы на ольхе *Alnus incana*, вызываемые клещом *Eriophyes laevis* Nalepa; (в) – жилковые галлы на листе граба *Carpinus orientalis*, вызываемые клещом *Aculops macrotricus* Nalepa; (г) – паренхиматозные (бляшковидные) галлы на рябине *Sorbus torminalis*, вызываемые клещом *Eriophyes sorbi* Canestrini; (д) – рожковидные галлы на липе *Tilia cordata*, вызываемые клещом *Eriophyes tiliae* Pagenstecher; (е) – схематическое строение мешковидного галла. (а–д) – ориг. данные. (е) – по: Ferreira et al., 2019, с изменениями. Обозначения: ВО – входное отверстие, ГК – галловая камера, ЛП – листовая пластинка, ПТ – питательная ткань, ПП – проводящий пучок.

обнаружило два совершенно разных ответа организма хозяина на воздействие паразитов (Westphal et al., 1981). Восприимчивыми к галлогенному воздействию укусов клещей были только 36%

растений, у которых в результате образовывались листовые галлы. Уже в течение первого часа после того, как клещ прокалывал хелицерами стенку эпидермальной клетки листа паслена, возле места

прокола начиналась аккумуляция растительного полисахарида каллозы. Ядра и ядрышки клеток эпидермы вокруг места прокола увеличивались в размерах и происходила дисперсия хроматина. В последующие часы отмечали деления этих клеток и начиналось постепенное формирование галла. Поврежденная клещом клетка эпидермы погибала. Однако окружающие эпидермальные клетки, по-видимому, каким-то образом получали от нее сигнал к дифференцировке в питательную ткань галла, клетки которой характеризовались несколько увеличенными размерами и более крупными ядрами и ядрышками, хотя анализ пloidности в данном случае не производили (Westphal et al., 1981; Westphal, 1982; Westphal, Manson, 1996). Таким образом, в этой серии работ было показано, что клещ воздействует на единичную клетку растения (впрыскивая слюну), а галлообразующий эффект захватывает целый участок листа.

С другой стороны, почти 2/3 зараженных клещами растений паслена (64%) не образовывали галлы (Westphal et al., 1981; Westphal, 1982). Тем не менее, на этих растениях клещи в считанные часы индуцировали реакцию гиперчувствительности в эпидерме листьев. Вокруг мест проколов уже в течение первого часа начиналась гибель клеток, отложение каллозы не происходило, а через 4 часа в некротических областях, которые были четко отграничены от нормальной (неповрежденной) ткани, обнаруживали полифенольные соединения. Примерно через 3 недели пятна некротических поражений на слегка деформированных листьях устойчивых растений имели диаметр 300–400 мкм. Время выживания клещей на этих устойчивых растениях не превышало 2–3 недель от момента заражения паслена (Westphal et al., 1990). Согласно работам последних лет (Golan et al., 2017; Wallis, Galarneau, 2020; Singh et al., 2021), полифенолы, широко распространенные метаболиты цветковых растений, обеспечивают их химическую защиту от разнообразных вредителей, в том числе от паразитических членистоногих.

Особый интерес представляют данные Вестфаль (Westphal, 1992), полученные в исследовании другой системы паразит–хозяин: эриофиодный клещ *Eriophyes eupadi* Newkirk и черемуха обыкновенная *Prunus padus* L. (Rosaceae). Был проведен анализ зависимости запуска галлогенеза от продолжительности питания клеща. Для этого клещей удаляли с листьев через различные промежутки времени после начала опыта, продолжавшегося 10 дней. На контрольных листьях к концу десятидневного срока сформировались полноценные молодые галлы с дифференцированной питательной тканью. Минимальное время контакта паразита с растением, необходимое для возникновения только небольших первичных выпячиваний участка листовой пластинки (“абортивные галлы”), составляло от 8 до 24 часов, причем

дальнейший галлогенез после удаления клещей не продолжался. Для того, чтобы сформировался маленький мешковидный галл, еще не имеющий питательной ткани (“неполноценный галл”), требовалось присутствие питающегося клеща на листе черемухи в течение 48 ч.

Таким образом, эксперименты, проведенные в лаборатории Вестфаль, показывают, что 1) степень развития галла зависит от продолжительности воздействия клеща; возможно, определяющим является минимальное критическое количество слюны, которое клещ должен ввести в растительную клетку, чтобы запустить галлогенез; 2) растения могут различаться по степени устойчивости к воздействию клещей и способны на один из двух типов реакций: либо формирование галлов, либо реакция сверхчувствительности, сопровождающаяся некрозом тканей.

КРАТКИЙ ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ ПОСЛЕДНИХ ЛЕТ ПО КЛЕЩЕВОМУ ГАЛЛОГЕНЕЗУ

Можно выделить несколько направлений исследований, касающихся индукции галлогенеза. Во-первых, в специальных экспериментах (de Lillo, Monfreda, 2004) было обнаружено, что слюна четырехногих клещей воздействует на колеоптили пшеницы сходно с тем, как действуют на колеоптили (усиливая их рост) ауксины и цитокинины. Эти фитогормоны играют важную роль в процессе нормального развития растений, участвуя в контроле клеточных делений, дифференцировки и морфогенеза (см., например: Fambrini, Pugliesi, 2013; van Berkel et al., 2013). Впоследствии данные о наличии ауксинов и цитокининов (преимущественно в слюнных железах) были получены в иммунохимическом анализе большого числа видов насекомых (Yamaguchi et al., 2012; Andreas et al., 2020; Ponce et al., 2021). Таким образом, возникла гипотеза о том, что эти фитогормоны (или их аналоги) синтезируются в слюнных железах галлообразующих членистоногих и, попадая в ткани растения–хозяина, модифицируют программу его нормального развития.

Во-вторых, хорошо известно, что многие виды членистоногих (как клещей, так и насекомых) часто находятся в симбиотических отношениях с различными бактериями (см., например: Zhang et al., 2016; Gätjens-Boniche, 2019; Hammer, Moran, 2019), причем такие бактериальные симбионты бывают как внутриклеточными, так и внутриполостными. На этом основании можно было бы предполагать, что вместе со слюной паразитического животного растение–хозяин получает также и бактерии, которые стимулируют формирование галлов. Тем не менее, недавнее исследование, проведенное на 12 видах насекомых (среди которых были как индуцирующие галлы виды, так и близко родственные виды,

не индуцирующие галлы), не поддержало данную гипотезу. Как указали авторы (Hammer et al., 2021, p. 1), “не было никаких специфических бактериальных таксонов, которые постоянно связаны с индукцией галлов”. Однако число видов, изученных в этой работе, было невелико. Кроме того, не был analyzed ряд характерных галлообразующих представителей насекомых из семейств Сynipidae и Cecidomyiidae. Исследовали в основном представителей семейств Aphididae (Hemiptera), Gelechiidae (Lepidoptera) и Tephritidae (Diptera). При этом клещи не были включены в анализ. Наконец, некоторые виды эриофиоидных клещей могут быть переносчиками фитопатогенных вирусов (de Lillo et al., 2018; Mansouri et al., 2021; Trzmiel et al., 2021 и др.), однако и в этом случае ничего не известно о том, могут ли вирусы–симбионты клещей быть причиной формирования галлов. Таким образом, говорить о возникновении четко сформулированной “симбиотической” (или “инфекционной”) гипотезы индукции галлогенеза представляется преждевременным.

В последние годы в число перспективных моделей для анализа листового галлогенеза вошла система, состоящая из эриофиоидного клеща *Fragariocoptes setiger* Nalepa и земляники зеленой (полунищи) *Fragaria viridis* Weston (Rosaceae) (Паутов и др., 2016; Raponova et al., 2018). Предполагается, что “морфологически галлообразование представляет собой изгибание клеточных пластов, слагающих пластинку листа, сопровождаемое изменением направления дифференциации их клеток” (Паутов и др., 2016, с. 1406). Обсуждая гипотетическую схему формирования листовых галлов, эти авторы пытаются привлечь идеи из экспериментальной эмбриологии многоклеточных животных (Белоусов, 2005), согласно которым важную роль в морфогенезе клеточных пластов играют механические напряжения. Однако представляется, что такая попытка не вполне корректна по причине хорошо известных различий морфогенетических механизмов у многоклеточных животных и высших растений (Иванов, 2011). В частности, из-за наличия в растительном организме клеточных стенок в процессе его развития нет ни миграций индивидуальных клеток, ни перемещений клеточных пластов. Как бы то ни было, детальный анализ возможной роли механических напряжений для морфогенеза клещевых галлов на листьях земляники (или каких-либо других растений) пока не опубликован.

Впоследствии та же группа авторов (Raponova et al., 2018) выполнила комплексный морфологический (гистологический) и молекулярно-генетический анализ галлов на землянике. Было выделено 4 стадии роста галлов: первая стадия примерно соответствует “абортному галлу” Вестфаль (Westphal, 1992), вторая стадия примерно соответствует “неполноценному галлу” Вестфаль, тогда как

третья и четвертая стадии соответствуют полноценным молодым и зрелым галлам Вестфаль. Онтогенез галла начинается активацией антиклинальных клеточных делений в мезофилле и эпидерме (на стадии 1). Позднее протекают как антиклинальные, так и периклинальные деления; пролиферация клеток галла продолжается на стадиях развития 2 и 3. Весьма интересной находкой авторов можно считать обнаружение инверсии адаксиально-абаксиальной полярности эпидермы в ходе роста галлов. Наконец, отметим, что в этой же публикации (Raponova et al., 2018) приведены подробные данные о том, как в процессе галлогенеза изменяется экспрессия генов клеточного цикла *CYCD3* и *CYCB1*, а также генов, кодирующих гомеодоменные транскрипционные факторы из семейств *KNOX* и *WOX*. Интенсивность экспрессии всех упомянутых генов усиливалась в течение стадии 2, оставалась на высоком уровне на стадии 3 и резко падала к стадии 4. Из литературы известно, что гомеобоксные гены *KNOX* и *WOX* являются универсальными регуляторами нормального развития и разнообразия растений (Hake et al., 2004; Hay, Tsiantis, 2010; Gao et al., 2015; Radoeva et al., 2019; Conklin et al., 2020).

Таким образом, в рассмотренном нами примере клещевого галлогенеза (Raponova et al., 2018) имеет место изменение (модификация) нормальной генетической программы развития молодого листа растения–хозяина. Сходные данные об изменении генетической программы развития растения–хозяина были совсем недавно получены при изучении листового галлогенеза, индуцируемого насекомыми (Hirano et al., 2020). Система паразит–хозяин включала тлей *Schlechtendalia chinensis* Bell (Aphididae, Hemiptera, Insecta) и суммах яванский *Rhus javanica* L. (Anacardiaceae). На ранних этапах развития галла было показано усиление экспрессии генов *KNOX* и подавление экспрессии генов, связанных с регуляцией фотосинтеза. Подавление фотосинтеза в ходе галлогенеза под влиянием насекомых и клещей было показано во многих работах (Patankar et al., 2011; Carneiro et al., 2014; Kmiec et al., 2018; Takeda et al., 2019; Pestov, Ogorodnikova, 2020; Shih et al., 2020).

В новейшей литературе появились данные об участии элементов программ репродуктивного развития в реализации галлогенеза: обнаружена активация генов, обеспечивающих формирование репродуктивных органов (Schultz et al., 2019; Takeda et al., 2019). Показателен пример виноградной филлоксеры *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch (Phylloxeridae, Hemiptera, Insecta) и винограда прибрежного *Vitis riparia* Michx (Vitaceae) (Schultz et al., 2019). Некоторые листовые галлы винограда по внешнему виду напоминают цветки и плоды. По галлообразующим эриофиоидным клещам аналогичные данные пока отсутствуют.

Вестфаль (Westphal, 1983) утверждала, что выстилающая галловые камеры питательная ткань (с крупными клетками и полиплоидными ядрами) имеется только в клещевых галлах, а в галлах, индуцированных насекомыми ее нет. Такая точка зрения оказалась ошибочной и недавно было показано наличие типичной питательной ткани также и в галлах, индуцированных представителями насекомых из отрядов Diptera, Hymenoptera и Lepidoptera (Ferreira et al., 2017, 2019). Однако эти авторы предполагают, что питательная ткань отсутствует в галлах, индуцированных насекомыми из отряда Hemiptera (например, тлями). Последние питаются, по-видимому, непосредственно флоэмным соком, высасывая питательные вещества из проводящих пучков.

В публикациях лаборатории Вестфаль (Westphal et al., 1981; Westphal, 1982, 1992) подчеркивали, что клетки питательной ткани в индуцированных клещами листовых галлах дифференцируются из клеток эпидермы. Современные исследователи (Ferreira et al., 2017, 2019, 2020) утверждают, что питательная ткань в клещевых галлах может дифференцироваться не только из эпидермы листа, но также и из клеток паренхимы. Говоря об этих превращениях клеточных типов в ходе галлогенеза, авторы (Ferreira et al., 2019) используют термин “редифференцировка”. Однако в биологии развития и биологии клетки для обозначения изменений в дифференцировке на клеточном уровне обычно предпочитают использовать термин “трансдифференцировка” (например, Eguchi, Kodama, 1993). Ни сравнительное исследование питательной ткани клещевых галлов, ни молекулярно-генетический анализ ее развития пока не проводили.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование листового галла представляет собой сложную ростовую реакцию, которая происходит в тканях листа растения в ответ на инъекцию слюны четырехногих клещей. Анализируя галлогенез, исследователи сталкиваются с целым рядом явлений и процессов, традиционно находящимися в сфере интересов биологии развития: изменения экспрессии генов и активности клеточной пролиферации, поиск факторов, индуцирующих формообразование, трансдифференцировка клеток и тканей.

К настоящему времени наибольшие успехи достигнуты в отношении изучения изменений генной экспрессии в ходе галлогенеза, индуцируемого клещами на листьях (гены из семейств *KNOX* и *WOX*, а также гены клеточного цикла *CYCD3* и *CYCB1*). Однако анализ пролиферации в работах по галлогенезу базируется лишь на качественной оценке, без количественного учета делящихся клеток.

Природа агентов, индуцирующих клещевой галлогенез, и конкретные механизмы их передачи к растению до конца не выяснены несмотря на интенсивные исследования в этом направлении. Не исключено, что в разных взаимодействующих системах паразит–хозяин детали “клеточного и молекулярного диалога” этих двух участников отличаются. Такая идея перекликается с представлениями классической экспериментальной эмбриологии животных, согласно которым различные взаимодействующие системы имеют ряд общих особенностей, однако способ передачи индуцирующего стимула не является универсальным (Toivonen et al., 1976). Кроме того, молекулы, индуцирующие дифференцировку одной и той же структуры в раннем развитии животного, могут быть весьма разнообразны (см., например: De Robertis, Kuroda, 2004).

Особого внимания заслуживает сравнительно-цитологический и молекулярно-генетический анализ развития питательной ткани клещевых галлов, поскольку пока однозначно не ясно, из какого источника (клетки паренхимы или эпидермы листа) она происходит.

Таким образом, несмотря на значительное количество публикаций по индукции листового галлогенеза четырехногими клещами, прогресс в разработке этой проблемы с точки зрения биолога развития к настоящему времени сравнительно невелик. На наш взгляд в будущем необходимо использовать несколько (как минимум 2 или 3) модельных систем паразит–хозяин, причем желательно, чтобы на каждой из этих систем параллельно работали несколько групп исследователей. Главные открытия в области изучения биологии развития клещевых галлов еще не сделаны.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны С.И. Сухаревой за комментарии, сделанные при чтении рукописи этого обзора. Авторы признательны также двум рецензентам за критические замечания к первоначальному варианту статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-54-46003 СТ_а) и Зоологического института РАН (проект АААА-А19-119020790133-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке данного обзора люди и животные не использовались в качестве объектов экспериментального исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белюсов Л.В. Основы общей эмбриологии. М.: Изд-во МГУ, 2005. 368 с.
- Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с.
- Паутов А.А., Крылова Е.Г., Вишняков А.Э. и др. Влияние параметров роста листьев *Fragaria viridis* (Rosaceae) на галлогенез // Бот. журн. 2016. Т. 101. № 12. С. 1401–1410.
- Сухарева С.И. Четырехногие клещи на злаках. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1992. 232 с.
- Amrine J.W., Jr., Stasny T.A., Flechtmann C.H.W. Revised Keys to the World Genera of the Eriophyoidea (Acari: Prostigmata). West Bloomfield (Michigan), USA: Indira Publishing House, 2003. 244 p.
- Andreas P., Kisiala A., Emery R.J.N. et al. Cytokinins are abundant and widespread among insect species // Plants (Basel). 2020. V. 9(2):208. <https://doi.org/10.3390/plants9020208>
- Bolton S.J., Chetverikov P.E., Klompen H. Morphological support for a clade comprising two vermiform mite lineages: Eriophyoidea (Acariformes) and Nematolycidae (Acariformes) // Syst. Appl. Acarol. 2017. V. 22. № 8. P. 1096–1131.
- Bolton S.J., Bauchan G.R., Chetverikov P.E. et al. A rudimentary sheath for the smallest of “biting” chelicerae: the mouthparts of *Cunliffea* (Nematolycidae) and a new hypothesis on the origin of the stylet sheath of Eriophyoidea (Acariformes) // Int. J. Acarol. 2018. V. 44. № 8. P. 374–381.
- Bronner R., Westphal E., Dreger F. Chitosan, a component of the compatible interaction between *Solanum dulcamara* L. and the gall mite *Eriophyes cladophthirus* Nal. // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989. V. 34. № 2. P. 117–130.
- Carneiro R.G.S., Castro A.C., Isaias R.M.S. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall // South Afr. J. Bot. 2014. V. 92. P. 97–104.
- Chetverikov P.E., Vishnyakov A.E., Dodueva I.E. et al. Gallogenesis induced by eriophyoid mites (Acariformes: Eriophyoidea) // Entomol. Rev. 2015. V. 95. № 8. P. 1137–1143.
- Chetverikov P.E., Bolton S.J., Gubin A.I. et al. The anal secretory apparatus of Eriophyoidea and description of *Phyllocoptes bilobospinosus* n. sp. (Acariformes: Eriophyoidea) from *Tamarix* (Tamaricaceae) from Ukraine, Crimea and USA // Syst. Appl. Acarol. 2019. V. 24. № 1. P. 139–157.
- Chetverikov P.E., Craemer C., Cyrković T. et al. Molecular phylogeny of the phytoparasitic mite family Phytoptidae (Acariformes: Eriophyoidea) identified the female genital anatomy as a major macroevolutionary factor and revealed multiple origins of gall induction // Exp. Appl. Acarol. 2021. V. 83. № 1. P. 31–68.
- Conklin P.A., Johnston R., Conlon B.R. et al. Plant homeodomain proteins provide a mechanism for how leaves grow wide // Development. 2020. V. 147(20): dev193623. <https://doi.org/10.1242/dev.193623>
- de Araújo W.S., de Freitas É.V.D., Kollár J. et al. Host specialization in plant-galling interactions: contrasting mites and insects // Diversity. 2019. V. 11(10):180. <https://doi.org/10.3390/d11100180>
- de Lillo E., Monfreda R. ‘Salivary secretions’ of eriophyoidea (Acari: Eriophyoidea): first results of an experimental model // Exp. Appl. Acarol. 2004. V. 34. № 3–4. P. 291–306.
- de Lillo E., Pozzebon A., Valenzano D. et al. An intimate relationship between eriophyoid mites and their host plants – a review // Front. Plant Sci. 2018. V. 9:1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01786>
- de Lillo E., Fanelli E., Valenzano D. et al. Characterisation of *Aceria massalongoi* and a histopathological study of the leaf galls induced on chaste trees // Exp. Appl. Acarol. 2020. V. 82. № 1. P. 33–57.
- De Robertis E.M., Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos // Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 2004. V. 20. P. 285–308.
- Eguchi G., Kodama R. Transdifferentiation // Curr. Opin. Cell Biol. 1993. V. 5. № 6. P. 1023–1028.
- Fambrini M., Pugliesi C. Usual and unusual development of the dicot leaf: involvement of transcription factors and hormones // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. № 6. P. 899–922.
- Fernandes G.W., Carneiro M.A.A., Isaias R.M.S. Gall-inducing insects: from anatomy to biodiversity // Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management / Eds. Panizzi A.R., Parra J.R.P. Boca Raton: CRC Press, 2012. P. 369–395.
- Ferreira B.G., Álvarez R., Avritzer S.C. et al. Revisiting the histological patterns of storage tissues: beyond the limits of gall-inducing taxa // Botany. 2017. V. 95. № 2. P. 173–184.
- Ferreira B.G., Álvarez R., Bragança G.P. et al. Feeding and other gall facets: patterns and determinants in gall structure // Bot. Rev. 2019. V. 85. № 1. P. 78–106.
- Ferreira B.G., Bragança G.P., Isaias R.M.S. Cytological attributes of storage tissues in nematode and eriophyid galls: pectin and hemicellulose functional insights // Protoplasma. 2020. V. 257. № 1. P. 229–244.
- Gao J., Yang X., Zhao W. et al. Evolution, diversification, and expression of KNOX proteins in plants // Front. Plant Sci. 2015. V. 6:882. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00882>
- Gätjens-Boniche O. The mechanism of plant gall induction by insects: revealing clues, facts, and consequences in a cross-kingdom complex interaction // Rev. Biol. Trop. 2019. V. 67. № 6. P. 1359–1382.
- Golan K., Sempruch C., Górska-Drabik E. et al. Accumulation of amino acids and phenolic compounds in biochemical plant responses to feeding of two different herbivorous arthropod pests // Arthropod-Plant Interact. 2017. V. 11. № 5. P. 675–682.
- Hake S., Smith H.M.S., Holtan H. et al. The role of *knox* genes in plant development // Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 2004. V. 20. P. 125–151.
- Hammer T.J., Moran N.A. Link between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects // Phil. Trans. Roy. Soc. B. 2019. V. 374: 20190068.

- Hammer T.J., De Clerck-Floate R., Tooker J.F. et al. Are bacterial symbionts associated with gall induction in insects? // *Arthropod-Plant Interact.* 2021. V. 15. № 1. P. 1–12.
- Hardy N.B., Cook L.G. Gall-induction in insects: evolutionary dead-end or speciation driver? // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10:257. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/257>
- Harris M.O., Pitzschke A. Plants make galls to accommodate foreigners: some are friends, most are foes // *New Phytol.* 2020. V. 225. № 5. P. 1852–1872.
- Hay A., Tsiantis M. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity // *Development.* 2010. V. 137. № 19. P. 3153–3165.
- Hesse M. Karyologische Anatomie von Zoocecidien und ihre Kernstrukturen // *Österr. Bot. Z.* 1968. Bd. 115. Hf. 1. S. 34–83.
- Hesse M. Über Mehrkernigkeit und Polyploidisierung der Nährgewebe einiger Milbengallen // *Österr. Bot. Z.* 1971a. Bd. 119. Hf. 1–3. S. 74–93.
- Hesse M. Häufigkeit und Mechanismen der durch gallbildende Organismen ausgelösten somatischen Polyploidisierung // *Österr. Bot. Z.* 1971b. Bd. 119. Hf. 4–5. S. 454–463.
- Hesse M. Über die Galle von *Dechiria nigrifasciata* WLSM. (Lepidoptera) an Blättern von *Periploca laevigata* AIT. (Asclepiadaceae) // *Österr. Bot. Z.* 1972. Bd. 120. Hf. 3. S. 213–222.
- Hirano T., Kimura S., Sakamoto T. et al. Reprogramming of the developmental program of *Rhus javanica* during initial stage of gall induction by *Schlechtendalia chinensis* // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11:471. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00471>
- Kane N.A., Jones C.S., Vuorisalo T. Development of galls on leaves of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* (Betulaceae) caused by the eriophyid mite *Eriophyes laevis* (Nalepa) // *Int. J. Plant Sci.* 1997. V. 158. № 1. P. 13–23.
- Keifer H.H. Eriophyoidea Nalepa. Injurious eriophyid mites // *Mites Injurious to Economic Plants* / Eds Jeppson L.R., Keifer H.H., Baker E.W. Berkeley (USA): Univ. California Press, 1975. P. 327–533.
- Kendall J. The structure and development of certain eriophyid galls // *Z. Parasitenkd.* 1930. V. 2. № 4. P. 477–501.
- Klimov P.B., O'Connor B.M., Chetverikov P.E. et al. Comprehensive phylogeny of acariform mites (Acariformes) provides insights on the origin of the four-legged mites (Eriophyoidea), a long branch with presumably massive basal extinction // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 119. P. 105–117.
- Kmieć K., Rubinowska K., Michałek W. et al. The effect of galling aphids feeding on photosynthesis photochemistry of elm trees (*Ulmus* sp.) // *Photosynthetica.* 2018. V. 56. № 4. P. 989–997.
- Mansouri F., Richert-Pöggeler K., Lewandowski M. et al. Transmission characteristics of allexiviruses by the eriophyid mite, *Aceria tulipae* (Keifer) (Acari: Eriophyidae) from naturally mixed infected garlic (*Allium sativum* L.) // *Eur. J. Plant Pathol.* 2021. V. 160. № 4. P. 789–796.
- Michalska K., Skoracka A., Navia D. et al. Behavioural studies on eriophyid mites: an overview // *Exp. Appl. Acarol.* 2010. V. 51. № 1–3. P. 31–59.
- Miller D.G., Raman A. Host-plant relations of gall-inducing insects // *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 2019. V. 112. № 1. P. 1–19.
- Moura M.Z.D., Soares G.L.G., Isaias R.M.S. Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae) // *Rev. Brasil. Bot.* 2009. V. 32. № 2. P. 271–282.
- Nalepa A. Neuer Katalog der bisher Beschriebenen Gallmilben, ihrer Gallen und Wirtspflanzen // *Marcellia.* 1929. Bd. 25. Hf. 1–4. S. 67–183.
- Nuzzaci G., Alberti G. Internal anatomy and physiology // Eriophyoid mites – their biology, natural enemies and control / Eds. Lindquist E.E., Sabelis M.W., Bruin J. Amsterdam: Elsevier, 1996. P. 101–150.
- Papouva S.S., Chetverikov P.E., Pautov A.A. et al. Gall mite *Fragariocoptes setiger* (Eriophyoidea) changes leaf developmental program and regulates gene expression in the leaf tissues of *Fragaria viridis* (Rosaceae) // *Ann. Appl. Biol.* 2018. V. 172. № 1. P. 33–46.
- Patankar R., Thomas S.C., Smith S.M. A gall-inducing arthropod drives declines in canopy tree photosynthesis // *Oecologia.* 2011. V. 167. № 3. P. 701–709.
- Pestov S.V., Ogorodnikova S.Yu. Status of the photosynthetic apparatus of woody plants damaged by gall mites // *Biol. Bull.* 2020. V. 47. № 10. P. 1392–1397.
- Petanović R., Kielkiewicz M. Plant–eriophyid mite interactions: cellular biochemistry and metabolic responses induced in mite-injured plants. Part I // *Exp. Appl. Acarol.* 2010a. V. 51. № 1–3. P. 61–80.
- Petanović R., Kielkiewicz M. Plant–eriophyid mite interactions: specific and unspecific morphological alterations. Part II // *Exp. Appl. Acarol.* 2010b. V. 51. № 1–3. P. 81–91.
- Polilov A.A. Small is beautiful: features of the smallest insects and limits to miniaturization // *Ann. Rev. Entomol.* 2015. V. 60. P. 103–121.
- Ponce G.E., Fuse M., Chan A. et al. The localization of phytohormones within the gall-inducing insect *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae) // *Arthropod-Plant Interact.* 2021. V. 15. № 3. P. 375–385.
- Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z. et al. Evolution, initiation and diversity in early plant embryogenesis // *Devel. Cell.* 2019. V. 50. № 5. P. 533–543.
- Raman A. Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions // *Flora.* 2011. V. 206. № 6. P. 517–533.
- Raman A. Gall-inducing insects and plants: the induction conundrum // *Curr. Sci.* 2021. V. 120. № 1. P. 66–78.
- Schultz J.C., Edger P.P., Body M.J.A. et al. A galling insect activates plant reproductive programs during gall development // *Sci. Rep.* 2019. V. 9(1):1833. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38475-6>
- Shih T.-H., Lin K.-H., Chen Y.-J. et al. Photosynthesis-related proteins of cup-shaped galls in *Litsea acuminata* leaves // *Taiwania.* 2020. V. 65. № 3. P. 407–412.
- Singh S., Kaur I., Kariyat R. The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(3):1442. <https://doi.org/10.3390/ijms22031442>
- Sinnott E.W. *Plant Morphogenesis.* New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Co., 1960. 550 p.

- Stone G.N., Schönrogge K. The adaptive significance of insect gall morphology // Trends Ecol. Evol. 2003. V. 18. № 10. P. 512–522.
- Takeda S., Yoza M., Amano T. et al. Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development // PLoS One. 2019. V. 14(10): e0223686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223686>
- Takeda S., Hirano T., Ohshima I. et al. Recent progress regarding the molecular aspects of insect gall formation // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22(17):9424. <https://doi.org/10.3390/ijms22179424>
- Toivonen S., Tarin D., Saxen L. The transmission of morphogenetic signals from amphibian mesoderm to ectoderm in primary induction // Differentiation. 1976. V. 5. № 1. P. 49–55.
- Trzmiel K., Szydło W., Hasiów-Jaroszewska B. Biological and molecular characterisation of the two Polish *Wheat streak mosaic virus* isolates and their transmission by wheat curl mites // Plant Protect. Sci. 2021. V. 57. № 3. P. 171–178.
- van Berkel K., de Boer R.J., Scheres B. et al. Polar auxin transport: models and mechanisms // Development. 2013. V. 140. № 11. P. 2253–2268.
- Wallis C.M., Galarneau E.R.-A. Phenolic compound induction in plant-microbe and plant-insect interactions: a meta-analysis // Front. Plant Sci. 2020. V. 11:580753. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.580753>
- Westphal E. Cécidogenèse et aspects structuraux de la galle en bourse de l'*Eriophyes padi* Nal. sur la feuille de *Prunus padus* L. // Marcellia. 1974. V. 38. P. 77–93.
- Westphal E. Modification du pH vacuolaire des cellules épidermiques foliaires de *Solanum dulcamara* soumises à l'action d'un acarien cécidogène // Can. J. Bot. 1982. V. 60. № 12. P. 2882–2888.
- Westphal E. Adaptation of gall mites (Acari, Eriophyoidea) to live in galls // Adaptations to Terrestrial Environments / Ed. Margaris N.S. N.Y.: Plenum Press, 1983. P. 69–75.
- Westphal E. Cecidogenesis and resistance phenomena in mite-induced galls // Biology of Insect-Induced Galls / Eds. Shorthouse J., Rohfritsch O. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1992. P. 141–156.
- Westphal E., Bronner R., Le Ret M. Changes in leaves of susceptible and resistant *Solanum dulcamara* infested by the gall mite *Eriophyes cladophthirus* (Acarina, Eriophyoidea) // Can. J. Bot. 1981. V. 59. № 5. P. 875–882.
- Westphal E., Dreger F., Bronner R. The gall mite *Aceria cladophthirus*. 1. Life cycle, survival outside the gall and symptoms' expression on susceptible or resistant *Solanum dulcamara* plants // Exp. Appl. Acarol. 1990. V. 9. № 3–4. P. 183–200.
- Westphal E., Manson D.C.M. Feeding effects on host plants: gall formation and other distortions // Eriophyoid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control / Eds. Lindquist E.E., Sabelis M.W., Bruin J. Amsterdam: Elsevier, 1996. P. 231–242.
- Yamaguchi H., Tanaka H., Hasegawa M. et al. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly // New Phytol. 2012. V. 196. № 2. P. 586–595.
- Zhang Y.-K., Chen Y.-T., Yang K. et al. A review of prevalence and phylogeny of the bacterial symbiont *Cardinium* in mites (subclass: Acari) // Syst. Appl. Acarol. 2016. V. 21. № 7. P. 978–990.

Induction of Leaf Galls by Four-Legged Mites (Eriophyoidea) as a Problem of Developmental Biology

A. G. Desnitskiy¹, * and P. E. Chetverikov², **

¹Department of Embryology, Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint-Petersburg, 199034 Russia

²Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 1, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: adesnitskiy@mail.ru

**e-mail: philipp-chetverikov@yandex.ru

The article deals with the publications of recent years on the formation of galls on the leaves of flowering plants infected with four-legged mites (Acariformes, Eriophyoidea). The literature data on several parasite–host pairs were used, since there is no universal model system for the experimental analysis of this problem. The gallogenesis is a complex growth reaction that occurs in the leaf tissues under the influence of mite saliva. Data on the possibility of transmission of phytohormones and symbiotic microorganisms from parasites to gall-forming plants are considered, but an important question about the nature of agents inducing mite galls remains open. In recent years, progress has been made in the study of gene expression during the development of galls on strawberry leaves. The mite galls are characterized by the presence of nutritive tissue, and comparative cytological and molecular genetic studies of its development and differentiation are of interest. It is also necessary to analyze the role and dynamics of changes in cell proliferation during gallogenesis, since the widespread ideas about the activation of cell divisions in the early stages of gall formation are based only on a qualitative evaluation, without quantitatively taking into account dividing cells.

Keywords: cell differentiation, cell proliferation, gallogenesis, inducing stimulus, nutritive tissue, parasitism

УДК 591,3

ГАНГЛИОЗИДЫ В РАЗВИТИИ ОРГАНИЗМОВ, ОРГАНИЗАЦИИ ПРЯМЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ПАТОЛОГИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

© 2022 г. В. Я. Бродский*

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

**e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

Поступила в редакцию 07.07.2021 г.

После доработки 18.10.2021 г.

Принята к публикации 21.10.2021 г.

Гликофинголипиды – ганглиозиды – одни из существенных факторов прямых межклеточных взаимодействий и развития организмов. Они вовлечены в патогенез ряда болезней, таких как болезнь Паркинсона и злокачественные опухоли, проявляясь как дефицит или избыток содержания определенных ганглиозидов сравнительно с нормальными тканями. Изменения ганглиозидов можно исправить, влияя на их синтез или секрецию (шеддинг). При влияниях на ганглиозиды облегчаются симптомы болезней.

Ключевые слова: ганглиозиды, межклеточные взаимодействия, онтогенез, болезнь Паркинсона, опухоли, генноинженерные модели

DOI: 10.31857/S0475145022010074

ВВЕДЕНИЕ

Ганглиозиды – обычные компоненты плазматической мембраны бактерий, клеток растений и животных, включая человека (лит. Nakomori, 1981; Ledeen, Yu, 1982; Tettamanti, Riboni, 1994; Kong et al., 1998; Proia, 2003; Schengrund, 2015). Первые ганглиозиды идентифицированы в начале 1940-х гг. в мозге (отсюда название), затем они обнаружены во всех органах, во всех клетках. У животных ганглиозиды – постоянный компонент не только плазматической мембраны, но также и крови.

В основе ганглиозидов находится церамид – сфинголипид, состоящий из сфингозина и жирной кислоты. Церамид синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме под действием церамидсинтазы и затем перемещается в аппарат Гольджи. Там к церамиду присоединяются углеводы и сиаловая кислота при действии синтаз и трансфераз. По числу остатков сиаловой кислоты различают разные типы ганглиозидов – моно- (GM), ди- (GD) или трисиаловые (GT). Внутри типа различают варианты – GD1, GD2 ... и их подразделения – GD1a, GD1b... . Варианты ганглиозидов обладают разными физиологическими свойствами. Выделено около 200 ганглиозидов, но в определенном органе в заметном количестве всего 3–5.

Из аппарата Гольджи ганглиозиды перемещаются на поверхность клетки, где входят в состав плазматической мембраны. Церамид является

компонентом внешней мембраны клеточной оболочки, а углеводная часть направлена в межклеточную среду и способна соединяться с разными лигандами. Ганглиозиды кожи могут служить барьером от проникновения в организм внешней воды и, с другой стороны, защищают от потерь воды, от обезвоживания организма. Часть ганглиозидов используется и в гиалоплазме для транспорта различных веществ, в частности ферментов, к органеллам. Утилизируются ганглиозиды в лизосомах.

Ганглиозиды могут быть рецепторами токсинов, например, холерного. Они изменяют активность ряда рецепторов – факторов роста, серотонина, инсулина. Ганглиозиды влияют на синтез белка и активность многих ферментов, а также на транспорт ионов. Они участвуют в адгезии клеток. Дефекты метаболизма ганглиозидов – одна из причин нарушений функций органов. Описаны болезни, совпадающие с недостаточностью ганглиозидов. При некоторых болезнях, напротив, наблюдают избыток ганглиозидов.

В экспериментах используют или препарат полной смеси ганглиозидов из мозга крупного рогатого скота (BBG, bovine brain gangliosides) или один определенный ганглиозид.

Таблица 1. Изменение концентрации GM1 (пМ/10⁶ клеток/1 ч) через сутки действия 1 мкМ PPPP на плотные культуры гепатоцитов (по: Brodsky et al., 2003)

Объект	Контроль	PPPP
Гепатоциты	53	29
Среда	2	0.2

ГАНГЛИОЗИДЫ В МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОММУНИКАЦИЯХ

В конце 1990-х гг. выяснилось, что бактерии и протисты не беспорядочные скопления клеток, а некие их сообщества. Стало понятно, что прямые межклеточные взаимодействия – первые регуляции в эволюции. Нервная система – позднее приобретение. Исследование межклеточных взаимодействий у млекопитающих началось задолго до бактерий. В таких работах используют клеточные культуры. Очевидно, что прямые взаимодействия клеток в культуре – единственный способ их общения.

Маркером прямых межклеточных взаимодействий стали околочасовые (ультрадианные) клеточные ритмы. Открытые случайно в конце 1950-х гг. околочасовые ритмы присущи основным свойствам клеток: синтезу белка, активности ферментов, дыханию (последний обзор: Brodsky, 2014).

Околочасовые (ультрадианные) ритмы исследуют в плотных или редких культурах; первым маркером был ритм синтеза белка (Brodsky et al., 2000). В плотных культурах с близкорасположенными клетками ритм обнаруживается через несколько минут после перенесения культур в свежую среду. В редких культурах с далеко отстоящими клетками ритм находят лишь через несколько часов. Добавление в среду с отмытыми редкими культурами некоторых веществ приводит к выявлению ритма синтеза белка через несколько минут. Первым выявленным веществом-синхронизатором были ганглиозиды. Потом нашли и другие синхронизаторы, например трансммиттеры крови.

Сначала апробировали смесь ганглиозидов BBG, как известно, содержащую 20% GM1, 40% GD1a, 16% GD1b, 20% GT1b и еще 4% ганглиозидов в минорных концентрациях. Исследование влияний разных доз BBG на редкие культуры гепатоцитов выявило ритм синтеза белка в концентрациях BBG 0.2–0.4 мкМ (Brodsky et al., 2000). Позже такой эффект BBG нашли также для кератиноцитов, и для мезенхимных стромальных клеток (Brodsky et al., 2011, 2012).

В печени в заметных концентрациях содержится пять разных ганглиозидов (Senn, Sellin, 1992). Мы исследовали все – GM3, GM1, GD1a, GD1b, GT1b в разных дозах (Brodsky et al., 2000). Эффективными в организации прямых межклеточных взаимодействий оказались два ганглиози-

да – GM1 и GD1a (рис. 1). Остальные изученные ганглиозиды не влияли на кинетику синтеза белка в редких культурах. Среди не эффективных был GM3, один из основных ганглиозидов в печени.

Для определения динамики накопления GM1 в клетках и в межклеточной среде флуоресцентным иммуноцитохимическим методом определено накопление этого ганглиозидов в культурах гепатоцитов (Звездина и др., 2000; Brodsky et al., 2000). В плотных группах гепатоцитов GM1 ярко светился через 60 мин после отмывания культуры. Ритм синтеза белка мы находили и раньше, то есть критичная концентрация ганглиозидов в среде образуется быстрее, чем за час. Анализ GM1 в среде обнаружил ганглиозид уже через 5 мин. Существенна не средняя концентрация синхронизатора в среде, а локальная вблизи клетки, что было показано Н.Д. Звездиной и др. (2000) в опытах с механической качалкой. В норме в плотных культурах ритм синтеза белка обнаруживают практически сразу после смены среды. Но если свежую среду в чашке с культурами перемешивать, ритм не виден даже через час.

Затем было исследовано влияние торможения синтеза ганглиозидов на прямые межклеточные взаимодействия. PPPP (1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol) тормозил синтез гликозилцерамидсинтазы, ключевого фермента синтеза ганглиозидов (Inokuchi, Radin, 1987; Abe et al., 1995).

В микромолярных дозах PPPP значительно тормозит, по данным Лэдиша и сотрудников, как синтез ганглиозидов, так и их отделение от клеток (шеддинг) в среду (Li, Ladisch, 1996; Olshefski, Ladisch, 1998; Kong et al., 1998). С помощью ELISA мы оценивали действие разных доз PPPP (от 0.5 до 10 мкМ) на содержание ганглиозидов-организатора GM1 в культурах гепатоцитов и нашли эффективным уже 1 мкМ PPPP (Brodsky et al., 2003). После PPPP в клетках оставалось примерно половина GM1, а в среде лишь 10% (табл. 1). В плотных культурах, обработанных PPPP, не нашли ритм синтеза белка (рис. 2). Действие 1 мкМ PPPP обратимо. Ингибитор не повреждает клетки. Через сутки в нормальной среде в культурах гепатоцитов, предобработанных PPPP, обнаружили ритм синтеза белка.

Об организующей функции ганглиозидов говорили и наши опыты с действием среды, кондиционированной плотными культурами, на редкие культуры. Среду редких культур заменяли на кондиционированную плотными культурами, нормальными или предобработанными PPPP. Ритм синтеза белка организовала только нормальная среда. Об организующей роли ганглиозидов говорило и быстрое восстановление ритма синтеза после введения в среду с плотными культурами, предобработанными PPPP, ганглиозидов.

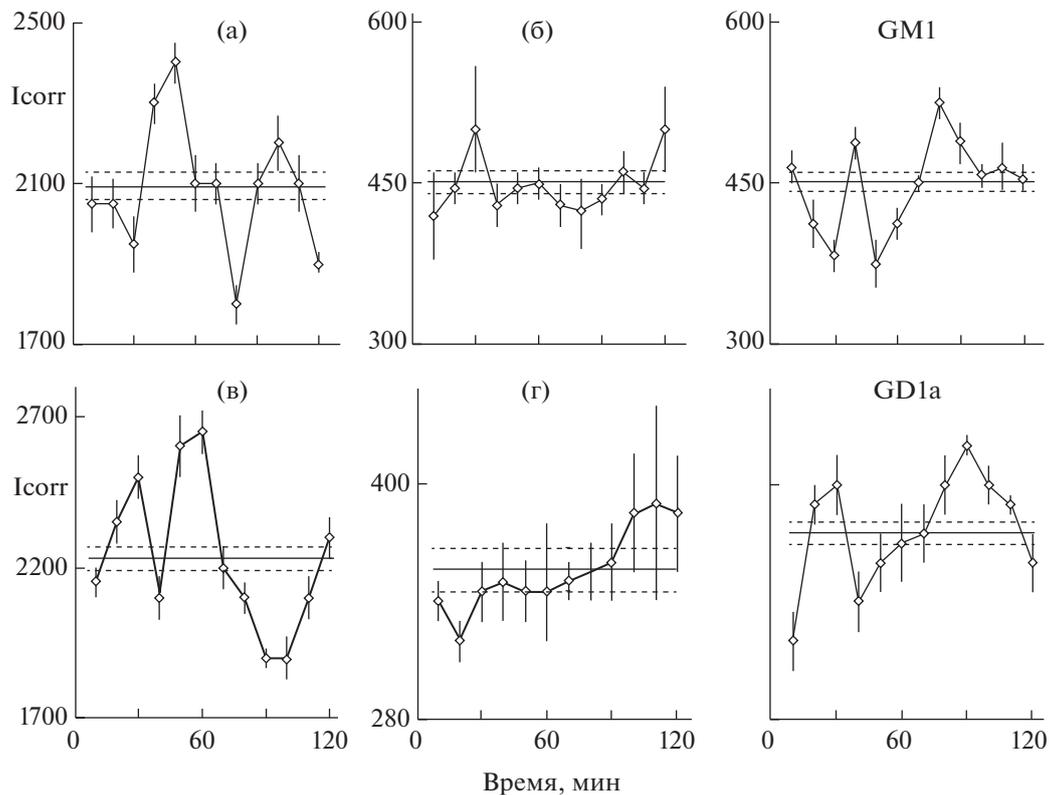


Рис. 1. Влияние ганглиозидов на кинетику синтеза белка в культурах гепатоцитов. Два опыта, каждый на одной крысе. (а) и (в) — отмытые плотные культуры в нормальной среде (бессывороточная среда 199 с добавлением альбумина и инсулина; (б) и (г) — редкие культуры тех же крыс в такой среде; справа сверху в среду таких редких культур ввели 0.06 мкМ GM1 на 30 мин до исследования синтеза белка; справа внизу в среду культур этого опыта ввели 0.15 мкМ GD1a на 30 мин. Пробы по 3 культуры каждая брали каждые 10 мин в течение 2 ч. По оси абсцисс — время (мин); по оси ординат включение ³H-лейцина с поправкой на пул лейцина Icorr. Прямая на каждом графике — среднее для данного варианта опыта; пунктирные прямые ±ошибка этого среднего (по: Brodsky et al., 2000, с изменениями).

Высокую активность в наших опытах проявили липосомы с GM1 (рис. 3). Ритм синтеза белка в редких культурах был выявлен при концентрации GM1 в суспензии липосом 0.0003 мкМ, тогда как минимальная эффективная концентрация свободного экзогенного GM1 0.06 мкМ (Бродский и др., 2003).

Как долго сохраняется синхронизирующий эффект ганглиозидов? Из опытов на редких культурах молодой крысы следует, что ганглиозиды работают, как триггер (Brodsky et al., 2005). После однократного их сигнала, когда в среде давно (4 дня) нет ВВГ, клетки все еще организуют ритм синтеза белка. Особое внимание уделили реакции старых крыс. В плотных культурах гепатоцитов старых крыс ритм синтеза белка определяется, но амплитуды ритма в клетках старых крыс вдвое ниже, чем у молодых. То же показано и на рис. 4. ВВГ значительно увеличил амплитуды ритма — с 34 до 63%. Средний уровень синтеза белка в каждом варианте опыта принят за 100%. Такой высокоамплитудный ритм сохранялся и после содержания культур, обработанных ВВГ,

еще сутки в свежей нормальной среде. То есть и в этом случае сигнал действовал как триггер.

С возрастом снижается концентрация ганглиозидов-организаторов GM1 и GD1a (рис. 5). Выше отмечено снижение межклеточных взаимодействий у старых животных. Введение ганглиозидов в среду с клетками старых животных или им самим *in vivo* нормализует взаимодействия (Brodsky, 2020).

К предположению об участии ганглиозидов в межклеточных взаимодействиях пришли более тридцати лет назад (обзор Накомогі, 1981). Гипотезу обосновывали всеобщее распространение ганглиозидов, их способность отделяться от одних клеток и встраиваться в другие клетки. Позже вывод был далее подтвержден убедительными, хотя и косвенными данными о постоянном присутствии ганглиозидов в межклеточной среде, их влиянием на транспорт ионов и активность ряда ферментов, и воздействием на состояние некоторых рецепторов. Мы обосновали вывод прямыми экспериментами. Выделены конкретные ганглиозиды и трансмиттеры организаторы, определена

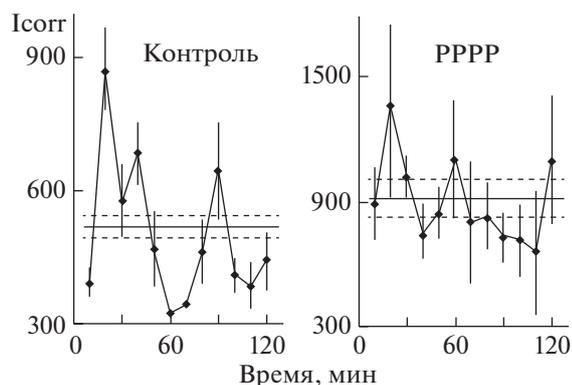


Рис. 2. Кинетика синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов; действие ингибитора синтеза и шеддинга ганглиозидов PPPP. Контроль — суточные культуры отмыты, перенесены в свежую среду, и через сутки в них определен синтез белка. Справа — такие же отмытые культуры перенесли в среду с 1 мкМ PPPP и через сутки в них определили синтез белка (по: Brodsky et al., 2003, с изменениями).

цепь процессов, включающих синхронизацию клеточной популяции (обзор Brodsky, 2018). Обосновано сохранение какое-то время эффекта синхронизации в памяти клеток.

ГАНГЛИОЗИДЫ И РАЗВИТИЕ

Влияние ганглиозидов на развитие организма, особенно нервной системы, показано в генно-инженерных исследованиях (Sheikh et al., 1999; Proia, 2003; Furukawa et al., 2004; Ohmi et al., 2012).

Первая ступень биосинтеза гликофинголипидов, включая ганглиозиды, катализируется гликоцерамидсинтазой; к керамиду присоединяется глюкоза. Фермент кодируется геном *Ugcg*. Повреждение гена приводит к гибели эмбрионов; они не способны пройти гастрюляцию. Мутанты по гену *GalNAcT*, кодирующего фермент синтеза ганглиозидов из лактатцерамида, следующего деривата

церамида, живут меньше нормальных мышей, хотя и становятся взрослыми. Самцы таких мышей стерильны; в семенниках блокирован мейоз и не образуются спермии. У мутантов преобладают простые ганглиозиды — GM3 и GD3. Практически нет ганглиозидов, основных в нормальном мозге, таких как GM1, GD1a, GD1b и GT1b.

Ганглиозиды GD1a и GT1b являются лигандами для гликопротеина, связанного с миелином, названного MAG. Этот белок синтезируется в глии и является одним из ведущих факторов взаимодействия нейронов и глии. MAG участвует в миелинизации аксонов, у MAG-дефицитных мышей с возрастом демиелинизируются некоторые нервы (Sheikh et al., 1999). Такой эффект наблюдали и при дефиците GD1a и GT1b в нервной системе после мутации гена *GalNAcT*. У таких мутантов нарушено поведение и иммунитет. Периферические нервы этих мышей не способны к регенерации.

Мутанты с поражением многих ганглиозидных генов, но сохранившие нормальное содержание и активность ганглиозидов GM1 и GD1a, по жизнеспособности и поведению мало отличаются от нормы. Вновь отмечу, что эти два ганглиозиды участвуют в регуляции прямых межклеточных взаимодействий (см. выше).

Среди многих исследований ганглиозидов при разных патологиях отмечу, прежде всего, два цикла работ. Они обращают внимание на возможность стимуляции активности ганглиозидов или, наоборот, на необходимость торможения их синтеза и шеддинга (секреции) для улучшения состояния больного человека.

ГАНГЛИОЗИДЫ И НЕВРОПАТОЛОГИЯ. ДРУГИЕ ПАТОЛОГИИ

В ряде работ отмечается дефицит ганглиозидов GM1 и GD1a при некоторых невропатологиях и, прежде всего, при болезни Паркинсона (рис. 6). Основные сведения опубликованы группой Le-

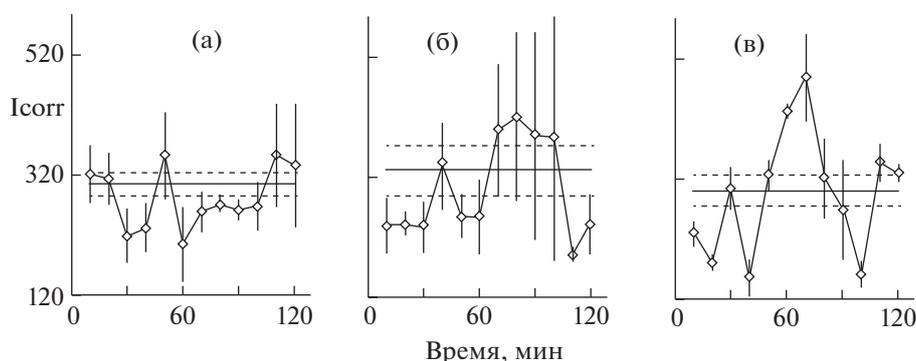


Рис. 3. Кинетика синтеза белка в редких культурах гепатоцитов: (а) — в нормальной среде; (б) — в среде с 0.01 мкМ свободного экзогенного GM1 или (в) — в среде с 0.0003 мкМ GM1 в липосомах (по: Бродский и др., 2003, с изменениями).

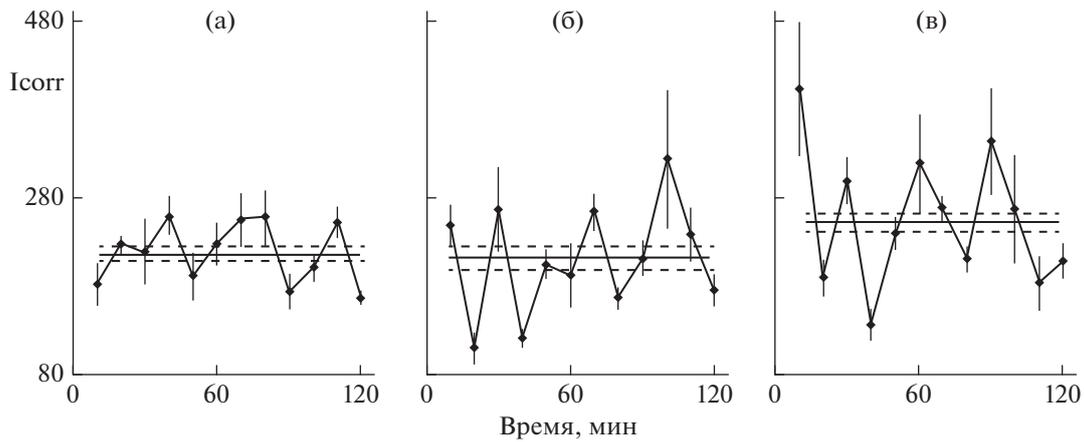


Рис. 4. Сохранение влияния ганглиозидов (BGG) на кинетику синтеза белка в плотных культурах старой крысы: (а) — контроль, суточные культуры в нормальной среде; (б) — такие культуры в среде с 0.3 BGG 30 мин, отмыты и перенесены в нормальную среду, и исследован синтез белка; (в) — культуры, преобработанные BGG, отмыты, и через сутки в нормальной среде в таких культурах исследован синтез белка (по: Brodsky et al., 2005, с изменениями).

deen et al. (Wu et al., 2012, 2020; Nadaczek et al., 2015; Ledeen, Wu, 2015, 2017). Напомню еще раз, что по нашим данным именно эти два ганглиозида из изученных нами пяти мажорных для печени и нервной системы регулируют прямые межклеточные взаимодействия, организующие ритм синтеза белка.

GM1 один из главных ганглиозидов рафтов, лабильных структур плазматической мембраны. Рафты способствуют перемещению белков в мембране, в частности, некоторых иммуноглобулинов и рецепторов. Теперь показано, что ганглиозиды регулируют функции рафтов. У мышей мутантов по гликозилтрансферазе и синтазам ганглиозидов показаны драматические изменения рафтов в клетках *in vitro* и *in vivo* (Furukawa et al., 2004; Ohmi et al., 2012).

Связываясь с гликопротеинами и протеогликанами среды, GM1 образует вблизи клеток гидрофильный слой, влияя на адгезию клеток, сигнальные функции и межклеточные взаимодействия. GM1 влияет на транспорт ионов кальция через плазматическую мембрану и потоки кальция внутри клетки (Sano et al., 2009). Показано влияние GM1 на активность аденилатциклазы в плазматической мембране. Это один из путей регуляции содержания АТФ и цАМФ. По нашим данным при этом активируются протеинкиназы, ключевой процесс межклеточной кооперации.

Некоторые исследования относятся к генетическим инженерным моделям болезни Паркинсона (Wu et al., 2012; Nadaczek et al., 2015). В одной мутантной мышшиной линии разрушены оба аллеля гена *B4galnt1*, и такие мыши полностью лишены GM1. В другой гетерозиготной линии разрушен лишь один аллель (рис. 6). У таких мутантов концентрация GM1 снижена на 45–60%. Не ме-

нее снижена концентрация GD1a, тогда как GD1b и GT1b изменены мало сравнительно с нормальными мышами. У мышей обеих мутантных линий проявляются разные симптомы болезни Паркинсона: нарушения моторики и координации движений, гибель дофаминовых нейронов и т.д.

Нейротрофическая роль ганглиозидов предполагалась еще Хакомори (Hakomori, Igarashi, 1993). Вскоре экспериментально было показано, что GM1 усиливает активность фактора роста нервов (Rabin, Mocchetti, 1995). Показано, что экспонирование клеток глиомы с НФР значительно повышает фосфорилирование рецепторов НФР. К такому эффекту приводит и экспонирование клеток с GM1, т.е. нейротрофический эффект этого ганглиозида может быть связан с воспроизведением им действия НФР, активируя его рецепторы.

Позже показаны и другие значимые роли GM1 в нервной системе (Ledeen et al., 1998; Ledeen, Wu, 2010). GM1 модулирует активность некоторых рецепторов, включая Na/K-АТФ-азы и опиоидные. Влияет на кальциевые каналы и тем самым на все функции нейрона. Этот ганглиозид регулирует действие нейротрофического фактора (GDNF), выделяемого глиальными клетками (Nadaczek et al., 2015). Сигнальный фактор необходим для выживания катехоламинэргических нейронов. При дефиците GM1 и активности фактора GDNF в болезни Паркинсона происходит гибель дофаминовых нейронов.

Повышение концентрации GM1 необходимо для регенерации периферических нервов (Karraganula et al., 2014). В опытах на крысах показано, что после перерезки седалищного нерва происходит конверсия GD1a и GT1b в GM1 с помощью Neu3-сиалидазы. После перерезки нерва концен-

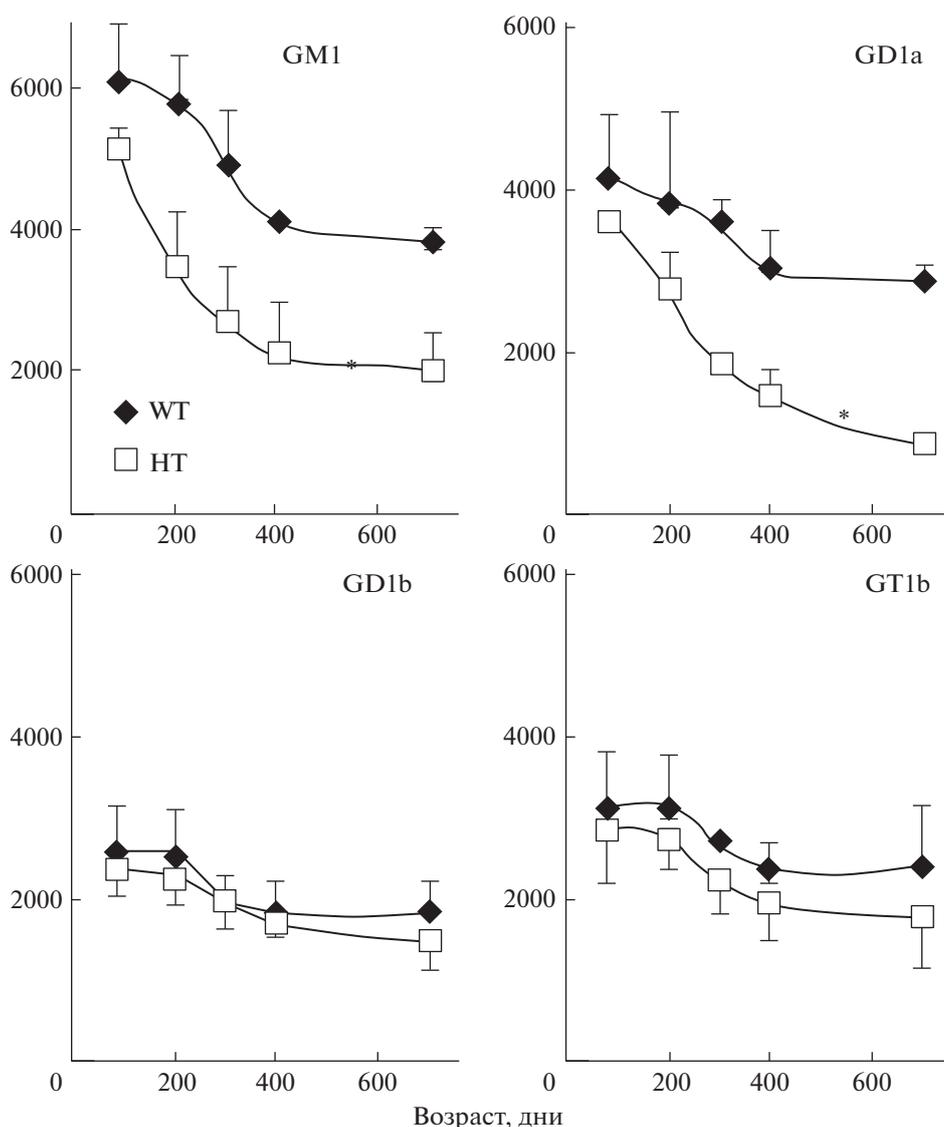


Рис. 5. Изменения с возрастом мышей четырех ганглиозидов. WT – нормальные мыши, HT – гетерозиготные мутанты по гену синтеза GM1 (см. в тексте). Ось абсцисс – возраст мышей (дни), ось ординат – концентрация ганглиозидов, пМоль/мг белка (по: Wu et al., 2012, с изменениями).

трация GM1 возрастает в несколько раз в течение 6 ч и остается высокой 12 ч. У мутантов с инактивированной сиалидазой регенерация не происходит. Инъекция сиалидазы крысе стимулирует регенерацию.

Участие GM1 в этиологии болезни Паркинсона обосновано положительным влиянием GM1 на симптомы этой болезни. Первые наблюдения на животных моделях относятся к 1980-м годам. Известны современные данные о положительном эффекте GM1 на людей с болезнью Паркинсона. Больным людям ежедневно вводили GM1 (Schneider et al., 2010, 2015). После 16-недельного курса значительно снизились моторные и другие симптомы болезни. 26 пациентов наблюдали 5 лет по-

сле курса GM1. Симптомы болезни оставались сниженными.

Фармакологический аналог GM1, названный LIGA20 (Kharlamov et al., 1993), значительно эффективнее GM1 в подавлении симптомов болезни Паркинсона. В отличие от самого ганглиозида, LIGA20 проникает через гематоэнцефалический барьер и затем через плазматическую мембрану нейронов. Его внутрибрюшинное введение мышам-моделям значительно облегчало их состояние и продлевало жизнь. К сожалению, в клинической практике LIGA20 не может использоваться из-за токсического его действия при длительном применении (личное сообщение профессора Ledeen; проводится поиск других

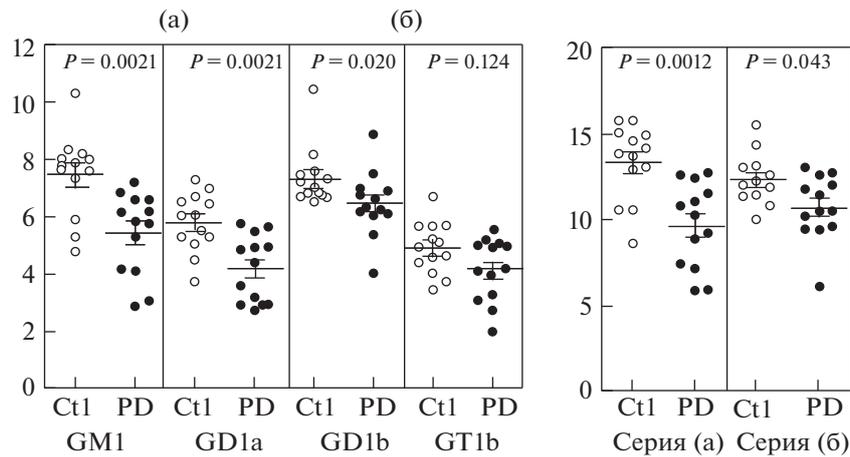


Рис. 6. Концентрация ганглиозидов в затылочной коре мозга мышей в норме (Ctl, белые кружки) и у мышей-мутантов с симптомами болезни Паркинсона (PD, черные кружки). Ось ординат – концентрация в нмоль/мг белка (по: Nadaczek et al., 2015, с изменениями).

аналогов GM1). Одна из возможностей использования LIGA20 – ввести его в липосомы; эффективная концентрация может быть снижена в сотни раз (рис. 3). Странно, что эти данные и результаты Шнейдеров не привлекли внимания врачей-практиков. Болезнь Паркинсона пока не лечится. Любая попытка снизить хотя бы симптомы этой болезни интересна.

Дефицит ганглиозидов свойственен и такой нейродегенеративной болезни как хроническая хореза, или болезнь Хантингтона (Desplats et al., 2007). Болезнь характеризуется моторными, психиатрическими и когнитивными нарушениями. Показано нарушение метаболизма ганглиозидов при этой болезни, ненормальная экспрессия гликозилтрансфераз. Снижена концентрация ганглиозидов GD1a, GD1b, GT1b и более всего концентрация GM1.

Недавно выделен особый класс нервных болезней – ганглиозидозы, обусловленные ненормальным катаболизмом ганглиозидов, избыточным их накоплением в клетках (Sandhoff, Harzer, 2013). Болезни обусловлены врожденными дефектами гидролаз и некоторых белков. Ганглиозидозы ведут к слепоте и идиотизму молодых людей. Пока лечения нет. Надежду внушает создание мышинных моделей.

В последнее время определили изменения сфинголипидов при сердечно-сосудистых заболеваниях (обзор: Алесенко и др., 2019). Инсульты и инфаркты – основная причина смерти людей. Нарушения липидного обмена давно считают одними из основных рисков возникновения таких болезней. Теперь, кроме изменений холестерина и триглицеридов, отметили нарушения метаболизма и сфинголипидов, включая ганглиозиды, причем важную роль имеет базовый их компо-

нент – церамид. Уровень сфинголипидов меняется при ишемии, гипертонии, инфаркте миокарда. Предлагается измерять уровень сфинголипидов в плазме крови, как дополнительный тест в диагностике и прогнозе сердечно-сосудистых заболеваний и прежде всего инфаркта.

ИЗМЕНЕНИЯ ГАНГЛИОЗИДОВ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Давно известно увеличение содержания ганглиозидов в злокачественных опухолях (Mora et al., 1969). Дальнейшие исследования подтвердили первые наблюдения, и при этом была показана корреляция между содержанием ганглиозидов и частотой метастазов опухоли (Itaya et al., 1976; Skipski et al., 1981). Кроме различных клеточных линий, такая корреляция отмечена и для некоторых опухолей. Показательные примеры – клеточные линии мышинной меланомы и лимфомы человека. В опухолях наиболее распространены простые ганглиозиды – GD3 и GM3, исходные в двух линиях превращений (рис. 7). Высокая концентрация GD3 и активность фермента его синтеза особенно характерна для нейробластомы крысы и рака прямой кишки человека, а для GM3 ганглиозида типично повышение концентрации в меланоме и в раке мочевого пузыря, где много и GD2. Некоторые ганглиозиды, минорные в нормальных клетках, начинают экспрессироваться в опухолях (Fredman, 1994). В быстро растущих метастазах ганглиозидов больше, чем в медленно растущих метастазах. Моноклональные антитела к “опухолевым” ганглиозидам тормозят рост опухоли (обзор по этому циклу работ см. Segui et al., 2006).

Выделение (шеддинг) ганглиозидов опухолевыми клетками в среду – важный маркер прогрес-



Рис. 7. Ганглиозиды в разных состояниях организма (синим). Опыт нормализации (красным). PPPP – ингибитор синтеза ганглиозидов.

сии опухоли. Среди многих работ этого направления отмечу исследования группы С. Лэдиша (Stephan Ladisch); одно из первых опубликовано уже в 1983 году (Ladisch et al., 1983). Было показано, что концентрация ганглиозидов в высокотуморогенной линии клеток лимфомы мыши более чем в 100 раз выше, чем в линии, клетки которой слабо прививаются (Ladisch et al., 1987). Клетки второй линии выделяют в 90 раз меньше ганглиозидов, чем высокотуморогенные. Клетки этой линии прививаются намного хуже, чем клетки с высоким содержанием ганглиозидов и высоким шеддингом; требуется в 1000 раз большее число клеток. Интересно: клетки низкотуморогенной линии можно преобразовать в высокотуморогенные, добавив в их среду ганглиозиды, выделенные из высокотуморогенного клона. Наблюдения пациентов с нейробластомой показали отрицательную корреляцию выживания людей с уровнем ганглиозида GD2 в опухоли (Valentino et al., 1990).

Показано влияние ганглиозидов на иммунную систему (Ladisch et al., 1983; Gonwa et al., 1984; Shaposhnikova et al., 1989; Bergelson et al., 1995;

Таблица 2. Изменения интенсивности синтеза и шеддинга ганглиозидов по данным радиоактивности меченых ганглиозидов после 3-дневной обработки линии клеток нейробластомы человека ингибитором PPPP; расчет на чашку с клетками (Li, Ladisch, 1996)

PPPP, млМ	Синтез, dpm	Шеддинг, dpm
0 контроль	61152	1454
10	3308	208
20	2700	120

Bergelson, 1995; Li et al., 1996a, 1996b). Так, ганглиозиды, выделенные из линии клеток нейробластомы, сильно подавляют иммунный ответ аллогенных нормальных клеток мыши *in vivo* (Li et al., 1995). Затем это было показано для основного ганглиозида нейробластомы – GD2 (Li et al., 1996). Восстановление иммунных клеток и некоторых других свойств нормальных тканей достигалось подавлением ключевого фермента синтеза всех ганглиозидов гликозилцерамидсинтазы препаратом PPPP (см. выше). По данным Р. Ли и С. Ладиша (Li, Ladisch, 1996) синтез ганглиозидов тормозится PPPP в разных опухолях примерно в 20 раз и шеддинг – 7–20 раз. В наших работах при обработке культур нормальных гепатоцитов PPPP их шеддинг подавлялся на 90% при использовании в 10 раз меньшей дозы PPPP (табл. 1).

Шеддинг ганглиозидов раковыми клетками и усвоение этих ганглиозидов нормальными клетками изящно показаны в опытах на двойных культурах (Olshefski, Ladish, 1998). Меченые ганглиозиды клеток медуллобластомы были обнаружены в нормальных фибробластах, отделенных от раковой культуры мембранным фильтром. После обработки раковых клеток ингибитором PPPP переход ганглиозидов полностью подавлялся. При этом структура фибробластов не страдала, и в этой культуре находили митозы.

Выше отмечено туморогенное действие ганглиозидов, выделенных из лимфомы, на клетки низкораковой линии (Ladisch et al., 1987). Затем показали подавление шеддинга клеток эпидермоидной карциномы (Barbour et al., 1992) и нейробластомы (Li, Ladisch, 1996, 1997), а также клеток меланомы после обработки их PPPP. В последнем случае синтез ганглиозидов снижался на 86–90%. Деления лимфоцитов в органах иммунитета не страдали. Индуктор дифференцировки – ретиноевая кислота стимулировала рост нейритов в клетках нейробластомы. Если обработать культуры холерным токсином, блокирующим рецепторы ганглиозида GM1, или ввести в среду антитела к GM1, ретиноевая кислота не стимулирует рост нейритов. Вновь отмечу универсальную роль GM1 в разных функциях и в патологии.

Мышам вводили подкожно клетки меланомы (Wen Deng et al., 2000). У всех образовались опухоли с метастазами. Другие мыши той же линии получали клетки, обработанные PPPP в условиях, не тормозящих пролиферацию клеток. У таких мышей опухоли возникли лишь у 40% животных, и метастазы были лишь у 25%. Среди многих исследований, показавших положительное влияние PPPP для профилактики и терапии опухолей, отмечу еще два (Inokuchi et al., 1990; Kyogashima et al., 1996).

Работы разных авторов позволили классику исследования ганглиозидов Й. Хакомори (Нако-

tori, 1991) рассмотреть новую стратегию терапии опухолей. Подобные отношения рассмотрены и в другом обзоре (Radin, 1994).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Казалось бы, вывод о значимости ганглиозидов в жизни организма тривиален: как часть плазматической мембраны, ганглиозиды участвуют во всех функциях и в проявлениях патологии. Однако, современные данные определили специфическое, хотя и не уникальное участие именно ганглиозидов в разных жизненно важных процессах. Рис. 7 обобщает эти сведения. Красным выделены факторы улучшения состояний старого или больного человека.

Отмечены свойства ганглиозидов, неизвестные даже в 1980-е годы, а некоторые и в 2010-е. Так выяснилось участие некоторых ганглиозидов в организации прямых межклеточных взаимодействий. GM1 и GD1a из пяти изученных, основных в печени и в мозге, организуют ритм синтеза белка в разных клетках *in vitro* и *in vivo*. Ганглиозиды не единственный фактор-организатор. Таков же эффект трансмиттеров крови – норадреналина и серотонина, а также мелатонина и некоторых лекарств модуляторов кальция. Но организующая функция ганглиозидов обоснована экспериментами впервые, хотя гипотез об этом хватало, начиная с классических работ 1980-х гг.

Исследование генноинженерных мутантов показало необходимость ганглиозидов для **развития**. Повреждение гена первого процесса превращения церамида в ганглиозиды приводит к остановке гастрюляции при ненарушенной проницаемости мембран бластомеров и не остановленным делениях дробления. Мутации поздних в становлении ганглиозидов генов ведут к нарушениям нервной системы, сокращению продолжительности жизни и изменениям поведения животных. Некоторые нарушения удается исправить, введя ганглиозиды. Отмечено, что мутанты с ненарушенным содержанием GM1 и GD1a по когнитивным показателям и некоторым другими параметрам нервной системы не отличаются от нормальных животных.

Среди многих изменений свойств организма и клеток при **старении** нашли и нарушения прямых межклеточных взаимодействий. Маркер процесса – амплитуда ритма синтеза белка – вдвое уменьшается у старых животных. При старении в организме наблюдали дефицит ганглиозидов-организаторов GM1 и GD1a, тогда как другие ганглиозиды, обычные в нервной системе и в печени, не изменялись. Ситуацию с организацией прямых межклеточных взаимодействий можно исправить, добавляя в среду с культурами клеток старых крыс или инъецируя старым животным

ганглиозиды. Таков же эффект обогащения сыворотки крови старых крыс ганглиозидом-организатором GM1.

Дефицит GM1 и GD1a, ганглиозидов-организаторов прямых межклеточных взаимодействий наблюдали при **болезни Паркинсона**. Показано положительное влияние ганглиозидов GM1 на симптомы болезни. Еще эффективнее действовал фармакологический аналог GM1. Инъекции людям ганглиозидов GM1 снижали тяжелые симптомы болезни – нарушения моторики и координации движений, тремора, когнитивных сбоев. Поскольку эффективных методов лечения болезни Паркинсона пока нет, удивительно, что работы с ганглиозидами не привлекли широкого внимания врачей.

Противоположный феномен – избыток ганглиозидов – сопровождается **канцерогенез**. Влияния на ганглиозиды могут облегчать течение злокачественных опухолей. В злокачественных опухолях содержание ганглиозидов и особенно GM3 и GD2 может быть намного больше, чем в аналогичных нормальных тканях. Показано туморогенное действие ганглиозидов, торможение ими иммунитета организма хозяина. В опухолях часто ненормально высокая активность фермента синтеза ганглиозидов гликозилцерамидсинтазы. Ингибитор этого фермента – PPPP – тормозит прогрессию опухоли.

В последнее время определили изменения содержания сфинголипидов в процессе **сердечно-сосудистых заболеваний**, основной причины смерти людей. Предлагается измерять уровень сфинголипидов в плазме крови, как дополнительный тест в диагностике и прогнозе сердечно-сосудистых заболеваний и прежде всего инфаркта.

Итак, ганглиозиды – важный фактор развития и функционирования организма, влияющий на основополагающие генетические и эпигенетические механизмы в течение всего онтогенеза. Как можно представить эффекты ганглиозидов? Как компоненты плазматической мембраны, ганглиозиды могут влиять на активность многих рецепторов: факторов роста, инсулина, серотонина, нейротрофических и других. Ганглиозиды и сами могут быть рецепторами, и их недостаток или избыток может сказываться на биологии клеток. Как сигнальные молекулы, ганглиозиды могут влиять на многие процессы в клетках, такие как синтез белка, активность ферментов, ионный транспорт. Они могут модулировать действие других сигналов. Значимость ганглиозидов отмечалась давно, но обосновывалась лишь всеобщим их распространением в клетках и способностью делиться от клетки и встраиваться в мембрану других клеток. Результат последних 20 лет – доказательство роли ганглиозидов прямыми физиологическими экспериментами, а в последние годы и генноинже-

нерными методами. Для медицины существенны все более широкие данные о вовлеченности ганглиозидов в этиологию некоторых нервных болезней, и прежде всего болезни Паркинсона, а также в прогрессию опухолей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, благодарю Н.Д. Звездину, основного соавтора работ по прямым межклеточным взаимодействиям. Большой вклад в эти исследования внесли Л.А. Мальченко и В.И. Фатеева, а также сотрудники Кардиоцентра Н.В. Проказова и Е.В. Грачева. Признателен М.В. Угрюмову, который познакомил меня с Др. Р. Лединым (R. Ledeen, USA), одним из основных исследователей ганглиозидов при болезни Паркинсона. Благодарю доктора С. Лэдиша (S. Ladisch, USA) за получение PPPP. Благодарю профессора В.В. Терских за замечания по тексту статьи и самой теме.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алесенко А.В., Затейщиков Д.А., Лебедев А.Т., Курочкин И.Н. Участие сфинголипидов в патогенезе атеросклероза // Кардиология. 2019. Т. 59. № 8. С. 77–87.
- Бродский В.Я. Околочасовые сигналы, метаболизм, функции. М.: Научный мир, 2021.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Кооперация гепатоцитов *in vitro* в ритме синтеза белка интенсифицируется ганглиозидом GM1 в везикулах и липосомах // Известия РАН. 2003. № 6. С. 650–657.
- Звездина Н.Д., Грачева Е.В., Голованова Н.К., Проказова Н.В., Нечаева Н.В., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Накопление ганглиозида GM1 в среде, кондиционированной культурой гепатоцитов крысы // Известия РАН. 2000. № 6. С. 410–419.
- Abe A., Radin N., Shayman J., Worting L., Zipkin R., Canem B. Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glycosylceramide synthase and tumor cell growth // J. Lipid Res. 1995. V. 36. P. 611–621.
- Barbour S., Edidin M., Felding-Habermann B., Taylor-Norton J., Radin N.S., Fenderson B.A. Glycolipid depletion using a ceramide analogue (PDMP) alters growth, adhesion, and membrane lipid organization in human A431 cells // J. Cell Physiol. 1992. V. 150. P. 610–619.
- Bergelson L.D. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators // Immunol. Today. 1995. V. 16. P. 483–486.
- Bergelson L.D., Dyatlovitskaya E.V., Klyuchareva T.E., Kryukova E.V., Lemenovskaya A.F., Matveeva V.A., Sinit-syna E.V. The role of glycosphingolipids in natural immunity. Gangliosides modulate the cytotoxicity of natural killer cells // Eur. J. Immunol. 1989. V. 19. P. 1979–1983.
- Brodsky V.Y. Circadian (Ultradian) metabolic rhythms // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 483–495.
- Brodsky V.Y. Biochemistry of direct cell-cell interactions. Signaling factors regulating orchestration of cell populations // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. P. 890–906.
- Brodsky V.Y. Cell-cell interaction disorders associated with senescence can be repaired // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. № 4. P. 261–266.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I. Ganglioside-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biol. Internat. 2000. V. 24. P. 211–222.
- Brodsky V., Zvezdina N., Nechaeva N., Novikova T., Gvasava I., Fateeva V., Gracheva H. Loss of hepatocyte co-operative activity after inhibition of ganglioside GM1 synthesis and shedding // Cell Biol. Internat. 2003. V. 27. P. 935–942.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Malchenko L.A. Small cooperative activity of old rat's hepatocytes may depend on composition of the intercellular medium // Cell Biol. Internat. 2004. V. 28. P. 311–316.
- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D., Nechaeva N.V., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Malchenko L.A. Single short-term signal that enhances cooperative activity of the old rat hepatocytes acts for several days // Cell Biol. Int. 2005. V. 29. P. 971–975.
- Brodsky V.Y., Terskikh V.V., Vasilyev A.V., Zvezdina N.D., Vоротельяк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Self-synchronization of the protein synthesis rhythm in HaCaT cultures of human keratinocytes // Rus. J. Dev. Biol. 2011. V. 42. № 4. P. 272–291.
- Brodsky V.Y., Vasiliev A.V., Terskikh V.V., Zvezdina N.D., Fateeva V.I., Malchenko L.A., Kiseleva E.V., Bueverova E.I. Mesenchymal stromal cells synchronize the rhythm of protein synthesis under the effect of an exogenous signal // Rus. J. Dev. Biol. 2012. V. 43. № 3. P. 196–198.
- Brodsky V.Y., Terskikh V.V., Vasilyev A.V., Zvezdina N.D., Vоротельяк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Self-synchronization of the protein synthesis rhythm in HaCaT cultures of human keratinocytes // Rus. J. Dev. Biol. 2011. V. 42. № 4. P. 272–291.

- Brodsky V.Y., Vasiliev A.V., Terskikh V.V., Zvezdina N.D., Fateeva V.I., Malchenko L.A., Kiseleva E.V., Bueverova E.I.* Mesenchymal stromal cells synchronize the rhythm of protein synthesis under the effect of an exogenous signal // *Rus. J. Dev. Biol.* 2012. V. 43. № 3. P. 196–198.
- Desplats P.A., Denny C.A., Kass K.E., Gilmartin T., Head S.R., Sutcliffe J.G., Seyfried T.N., Thomas E.A.* Glycolipid and ganglioside metabolism imbalances in Huntington disease // *Neurobiol. Dis.* 2007. V. 27. P. 265–277.
- Fredman P.* Gangliosides associated with primary brain tumors and their expression in cell lines established from these tumors // *Progress Brain Res.* 1994. V. 101. P. 225–240.
- Furukawa K., Tokuda N., Okuda T., Tajima O., Furukawa R.* Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function // *Seminars Cell and Develop. Biol.* 2004. V. 15. P. 389–396.
- Gonwa T.A., Westrick M.A., Macher B.A.* Inhibition of mitogen- and antigen-induced lymphocyte activation by human leukemia cell gangliosides // *Cancer Res.* 1984. V. 44. P. 3467–3470.
- Hadaczek P., Wu G., Sharma N., Ciesielska A., Bankiewicz K., Davidow A.L., Llu Z.-H., Forsayeth J., Ledeen R.W.* GDNF signaling implemented by GM1 ganglioside: failure in Parkinson's disease and GM1-deficient murine model // *Exp. Neurol.* 2015. V. 263. P. 177–189.
- Hakomori S.-I.* Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis // *Ann. Rev. Biochem.* 1981. V. 50. P. 733–750.
- Hakomori S.-I.* New directions in cancer therapy based on aberrant expression of glycosphingolipids // *Cancer Cells.* 1991. V. 3. P. 461–470.
- Hakomori S.-I., Igarashi Y.* Gangliosides and glycosphingolipids as modulators of cell growth, adhesion and transmembrane signaling // *Adv. Lipid Res.* 1993. V. 25. P. 147–162.
- Inokuchi I.-I., Radin N.S.* Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, inhibitor of murine glycosylceramide synthetase // *J. Lipid Res.* 1990. V. 28. P. 565–571.
- Itaya K., Hakomori S., Klein G.* Long-chain neutral glycolipids and gangliosides of murine fibroblast lines and their low- and high-tumorigenic hybrids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976. V. 73. P. 1568–1571.
- Kappagantula S., Andrews M.R., Cheah M., José Abad-Rodríguez J., Dotti C.G., Fawcett J.W.* Neu3 sialidase-mediated ganglioside conversion is necessary for axon regeneration // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 2477–2492.
- Kharlamov A., Guidotti A., Costa E., Hayes R., Armstrong D.* Semi synthetic sphingolipids prevent protein kinase C translocation and neuronal damage in the perifocal area following a photochemically induced thrombotic brain cortical lesion // *Neuroscience.* 1993. V. 13. P. 2483–2494.
- Kong Y., Li R., Ladisch S.* Natural form of shed gangliosides // *Biochem. Biophys. Acta.* 1998. V. 1394. P. 43–56.
- Kyogashima M., Inouea M., Setoa A., Inokuchi J.* Glucosylceramide synthetase inhibitor, D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol exhibits a novel decarcinogenic activity against Shope carcinoma cells // *Cancer Letters.* 1996. 10t. P. 25–30.
- Ladisch S., Gillard B., Wong C., Ulsh L.* Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell gangliosides // *Cancer Res.* 1983. V. 43. P. 3808–3813.
- Ladisch S., Kitada S., Hays E.F.* Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice // *J. Clin. Invest.* 1987. V. 79. P. 1879–1882.
- Ledeen R.W., Wu G.* In search of a solution to the sphinx-like riddle of GM1 // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. P. 1867–1874.
- Ledeen R.W., Wu G.* The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature // *Trends Biochem. Sci.* 2015. V. 40. P. 407–418.
- Ledeen R.W., Wu G.,* Gangliosides, α -synuclein, and Parkinson's disease // In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* V. 156. Gangliosides in Health and Disease / Eds. Schnaar R.L., Lopez P.H.H. Academic Press, 2017. P. 435–454.
- Ledeen R., Yu R.* Gangliosides: structures, isolation and analysis // *Methods Enzymol.* 1982. V. 83. P. 139–191.
- Ledeen R.W., Wu G., Lu Z.H., Kozireski-Chuback D., Fang Y.* The role of GM1 and other gangliosides in neuronal differentiation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. V. 845. P. 161–175.
- Li R., Villacreses N., Ladisch S.* Human tumor gangliosides inhibit murine immune responses *in vivo* // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 211–214.
- Li R., Gage D., McKallip R., Ladisch S.* Structural characterization and *in vivo* immunosuppressive activity of neuroblastoma GD2 // *Glycoconj. J.* 1996a. V. 13. P. 385–389.
- Li R., Ladisch S.* Abrogation of shedding of immunosuppressive gangliosides // *Cancer Res.* 1996b. V. 56. P. 4602–4605.
- Li R., Ladisch S.* Inhibition of endogenous ganglioside synthesis does not block neurite formation by retinoic acid-treated neuroblastoma cells // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 1349–1354.
- Mora P.T., Brady R., Bradley R.M., McFarland V.W.* Gangliosides in DNA virus-transformed and spontaneously transformed tumorigenic mouse cell lines // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1969. V. 63. P. 1290–1296.
- Ohmi Y., Ohkawa Y., Yamauchi Y., Furukawa K.* Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. P. 1185–1191.
- Olshefski R., Ladisch S.* Synthesis, shedding, and intercellular transfer of human medulloblastoma gangliosides: abrogation by a new inhibitor of glucosylceramide synthase // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 467–472.
- Proia R.L.* Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2003. V. 358. P. 879–883.
- Rabin S.J., Mocchetti I.* GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA // *J. Neurochem.* 1995. V. 65. P. 3347–3354.

- Radin N.S.* Rationales for cancer chemotherapy with PDMP, a specific inhibitor of glucosylceramide synthase // *Mol. Chem. Neuropathol.* 1994. V. 21. P. 111–127.
- Sandhoff K., Harzer K.* Gangliosides and gangliosidoses // *J. Neuroscience.* 2013. V. 33. 25. P. 10195–10208.
- Sano R., Annunziata I., Peterson A., Moshiach S., Gomero E., d’Azzo A.* GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. P. 500–511.
- Schengrund C.L.* Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function // *Trends Biochem. Sci.* 2015. V. 40. P. 397–406.
- Schneider J.S., Sendek S., Daskalakis C., Cambi F.* GM1 ganglioside in Parkinson’s disease: results of a five year open study // *J. Neurological. Sci.* 2010. V. 292. P. 45–51.
- Schneider Jay. S., Cambi F., Gollomp S.M., Hiroto Uwabara H., Brašić J.R., Benjamin L.B., Endek S., Wong D.F.* GM1 ganglioside in Parkinson’s disease: pilot study of effects on dopamine transporter binding // *J. Neurol. Sci.* 2015. V. 356. P. 118–123.
- Segui B., Abadie N., Jaffrezou J., Benoist H., Levade T.* Sphingolipids as modulators of cancer cell death: Potential therapeutic targets // *Biochem. Biophys. Acta.* 2006. V. 1758. P. 2104–2120.
- Senn N.J., Sellin S.* Biosynthesis and excretion of gangliosides by isolated perfused rat liver // *Europ. J. Biochem.* 1992. V. 205. P. 809–814.
- Senn H.J., Orth M., Fitzke E., Wieland H., Gerok W.* Gangliosides in normal human serum. Concentrations, pattern and transport by lipoproteins // *Europ. J. Biochem.* 1989. V. 181. P. 657–662.
- Shaposhnikova G.I., Prokazova N.V., Buznikov G.A., Zvezdina N.D., Teplitz N.A., Bergelson L.D.* Shedding of gangliosides from tumor cells depends on cell density // *Europ. J. Biochem.* 1984. V. 140. P. 567–570.
- Sheikh K.A., Sun J., Liu Y., Kawai H., Gradford T.O., Proia R.L., Griffin J.W., Schaar R.L.* Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 90. P. 7532–7537.
- Skipski V.P., Carter S.P., Terebus O.I., Podlaski F.J., Peterson R.H., Stock C.C.* Ganglioside profiles of metastases and of metastasizing and nonmetastasizing rat primary mammary carcinomas // *J. Natl. Cancer Inst.* 1981. V. 67. P. 1251–1258.
- Tettamanti G., Riboni L.* Gangliosides turnover and neural functions // *Prog. Brain Res.* 1994. V. 101. P. 77–100.
- Valentino L., Moss T., Olson E., Wang H.J., Elashoff R., Ladisch S.* Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma // *Blood.* V. 75. P. 1564–1567.
- Wen Deng, Li R., Ladisch S.* Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation // *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. V. 92. P. 912–917.
- Wu G., Lu Z.-H., Kulkarni N., Ledeen R.W.* Deficiency of ganglioside GM1 correlates with Parkinson’s disease in mice and humans // *Neurosci. Res.* 2012. V. 90. P. 1997–2008.
- Wu G., Lu Z.-H., Ho Seo J., Alselehdar S.K., DeFrees S., Ledeen R.W.* Mice deficient in GM1 manifest both motor and non-motor symptoms of Parkinson’s disease; successful treatment with synthetic GM1 ganglioside // *Exper. Neurol.* 2020. V. 329. P. 1–12.

Gangliosides in Orchestration of Cell-Cell Communication, Development, Neuronal Pathology and Carcinogenesis

V. Y. Brodsky*

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

**e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

Glycosphingolipids – gangliosides – are one of the essential factors of direct cell-cell communication and the development of organisms. They are involved in the pathogenesis of a number of diseases, such as Parkinson’s disease and malignant tumors, manifesting themselves as a deficiency or surplus of the ganglioside content in comparison with normal tissues. It is possible to correct such disorders affecting the synthesis or secretion (shedding) of gangliosides. In terms of future clinical application: when the gangliosides are corrected, the symptoms of diseases may be alleviated.

Keywords: gangliosides, cell-cell communication, ontogenesis, Parkinson’s disease, tumors, genetic engineering models

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 591,3

ИЗМЕНЕНИЯ ОКРАСКИ РЕДКОГО ГЛУБОКОВОДНОГО СКАТА
РИЧАРДСОНА *BATHYRAJA RICHARDSONI* (ARHYNCHOBATIDAE,
RAJIFORMES, CHONDRICHTHYES) В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2022 г. А. М. Орлов^{a, b, c, d, e, f, *}, Н. И. Рабазанов^{d, f}, А. И. Никифоров^g

^aИнститут океанологии им. П.П. Шириова РАН (ИО РАН), Москва, 117218 Россия

^bВсероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО),
Москва, 107140 Россия

^cИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), Москва, 119071 Россия

^dДагестанский государственный университет (ДГУ), Махачкала, 367000 Россия

^eТомский государственный университет (ТГУ), Томск, 634050 Россия

^fПрикаспийский институт биологических ресурсов ДФИЦ РАН (ПИБР ДФИЦ РАН), Махачкала, 367000 Россия

^gМосковский государственный институт международных отношений (университет) МИД Российской Федерации –
МГИМО, Москва, Россия

*e-mail: orlov@vniro.ru

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 20.09.2021 г.

Исследованы особенности окраски дорсальной и вентральной сторон редкого глубоководного ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* (Arhynchobatidae) в диапазоне длин от 14 до 146 см и прослежены ее онтогенетические изменения. Представлены новые данные по окраске эмбрионов, неполовозрелых, созревающих и половозрелых особей. Показано, что вариации окраски дорсальной стороны незначительны, в то время как окраска вентральной стороны может значительно варьировать. Полученные данные могут быть использованы в таксономических и популяционных исследованиях, при разработке ключей для определения видов, подготовке фаунистических сводок и определителей, облегчить понимание особенностей окраски и ее изменений у глубоководных животных, обитающих в условиях постоянной темноты, а также расширить знания об отдельных аспектах макро- и микроэволюции глубоководных скатов.

Ключевые слова: скат Ричардсона *Bathyraja richardsoni*, окраска, онтогенетические изменения, глубоководные скаты, Северная Атлантика

DOI: 10.31857/S0475145022010050

ВВЕДЕНИЕ

Фауна глубоководных скатов даже наиболее изученной северной части Атлантического океана исследована недостаточно хорошо. Многие северо-атлантические виды описаны относительно недавно (во второй половине прошлого столетия) и известны до сих пор по небольшому числу находок (Orlov et al., 2006; Porteiro et al., 2017). К таким видам относится и скат Ричардсона *Bathyraja richardsoni*, впервые описанный из вод Новой Зеландии (Garrick, 1961; Garrick, Paul, 1974). Ареал данного вида расположен в северной и центральной Атлантике (от северо-восточной Канады и юго-западной Гренландии до Азорских о-вов и Мавритании) и в юго-западной Пацифике в водах Тасмании и Новой Зеландии (Ebert, Stehmann, 2013; Kulka et al., 2015; Porteiro et al., 2017), где он известен по разрозненным поимкам. Скат

Ричардсона – один из наиболее крупных видов глубоководных скатов, достигающий длины 175 см (Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Наибольшей численности он достигает в районе Срединно-Атлантического хребта (САХ) (Fossen et al., 2008) и является одним из наиболее глубоководных северо-атлантических скатов, поимки которого известны с глубин 501–3055 м с диапазоном максимальной встречаемости между 2100 и 2400 м (Orlov et al., 2006; Porteiro et al., 2017).

Скаты являются одной из наиболее уязвимых групп морских рыб по отношению к антропогенному воздействию (Dulvy, Reynolds, 2002), и отдельные страны и природоохранные организации уделяют повышенное внимание вопросам охраны и сохранения как хрящевых рыб в целом, так и скатов в частности (Орлов, 2005, 2008; Cavanagh, Gibson, 2007; Орлов, Шеверницкий, 2008; Орлов,

Литвинов, 2010; Goodwin, 2012). По версии Международного союза охраны природы (МСОП) скат Ричардсона отнесен к категории “Least Concern” (Kulka et al., 2015), т.е. в настоящее время угрозы антропогенного характера для него отсутствуют.

Несмотря на то, что данный вид является довольно многочисленным в сравнении с другими глубоководными скатами северной Атлантики, до сих пор его биология остается изученной недостаточно (Tempelman, 1973b; Orlov et al., 2006), а в большинстве опубликованных работ описываются преимущественно особенности морфологии данного вида (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973a, 1973b; Garrick, Paul, 1974; Stehmann, Merrett, 2001; Orlov et al., 2006, 2010; Orlov, 2011; Orlov, Cotton, 2011). Между тем, опубликованные сведения об окраске ската Ричардсона разрознены и ограничены. Штемманн и Мерретт (Stehmann, Merrett, 2001) описали окраску пяти извлеченных из яйцевых капсул эмбрионов. Ранее сведения об окраске нескольких крупных половозрелых скатов Ричардсона были описаны для экземпляров из вод Новой Зеландии (Garrick, 1961), северо-восточной (СВА) (Forster, 1965) и северо-западной (СЗА) Атлантики (Tempelman, 1973b), позднее обобщенные в региональных фаунистических сводках (Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). В целом, в указанных работах для окраски взрослых особей указывались такие общие признаки: дорсальная сторона тела однотонная, от пепельной до коричневой, с небольшими светлыми точками или пятнами и темной каймой на крыльях и нижних лопастях брюшных плавников (*V*); вентральная сторона тела заметно темнее дорсальной, с темной каймой на крыльях и нижних лопастях *V* и наличием белых участков вокруг рта, ноздрей и клоаки, на хвосте и у его основания, между грудными (*P*) и *V*, на нижних лопастях *V* и вершинах птеригоподиев.

Отсутствие опубликованных данных по окраске среднеразмерных скатов Ричардсона не позволяло исследовать закономерности изменений его окраски на протяжении всего жизненного цикла и выявить ее внутривидовую и онтогенетическую изменчивость. Подобные сведения имеют важное значение для таксономических и популяционных исследований, а также при разработке ключей для определения видов и подготовке фаунистических сводок и определителей. Кроме того, разработка данной проблемы может представлять более широкий фундаментальный интерес в плане осмысления особенностей окраски и ее изменений у глубоководных животных, обитающих в условиях постоянной темноты, а также способствовать лучшему пониманию отдельных аспектов макро- и микроэволюции (происхождение, расселение, формирование популяционных структур и др.) глубоководных скатов.

Цель работы – анализ всех доступных (собственных и литературных) данных по окраске ската Ричардсона, позволяющих проследить ее онтогенетические изменения в пределах всего видового ареала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для анализа вариаций окраски ската Ричардсона послужили 20 экземпляров обоих полов общей длиной от 14 до 146 см, исследованных первым автором в течение 2005–2010 гг. в различных музеях (табл. 1):

Зоологический музей университета г. Берген, Норвегия: ZMUB 19528 (*TL* 142 см, самка, 2534 м), ZMUB 17600 (*TL* 29 см, самка, 2534 м), ZMUB 19514-3 (*TL* 78 см, самец, 1911 м), ZMUB 19514-4 (*TL* 63 см, самка, 1911 м), ZMUB 19522-3 (*TL* 45 см, самка, 2364 м), ZMUB 19522-1 (*TL* 55 см, самец, 2364 м), ZMUB 19522-2 (*TL* 53 см, самка, 2364 м), ZMUB 19535 (*TL* 53 см, самец, 2534 м), ZMUB 19514-1 (*TL* 69 см, самка, 2280 м), ZMUB 19514-2 (*TL* 84 см, самец, 1911 м), ZMUB 19476 (*TL* 106 см, самка, 2288 м), ZMUB 19448 (*TL* 101 см, самка, 2534 м), ZMUB 19364 (*TL* 85 см, самка, 2951 м) – все из вод САХ;

Национальный музей естественной истории, г. Париж, Франция: MNHN 1999-1156 (*TL* 35 см, самец, 1975 м, СВА, восточнее Гибридных о-вов);

Британский музей естественной истории, г. Лондон, Великобритания: BMNH 1999.10.1.1 (*TL* 52 см, самец, 2441 м, глубина и место поимки неизвестны), BMNH 1999.10.1.2 (*TL* 69 см, самец, 2441 м, глубина и место поимки неизвестны), BMNH 1999.2.2.1 (*TL* 22 см, самец, 1541 м, СВА восточнее Ирландии), BMNH 1999.2.2.2 (*TL* 25 см, самец, 1541 м, СВА восточнее Ирландии), BMNH 1999.2.2.3 (*TL* 24 см, самка, 1541 м, СВА восточнее Ирландии), BMNH 1999.2.2.4 (18 см, самка, 1541 м, СВА восточнее Ирландии).

Кроме того, для сравнения привлечены литературные данные об окраске, фотографии или рисунки экземпляров из вод Новой Зеландии (Garrick, 1961), СВА (Forster, 1965) и СЗА (Tempelman, 1973a), а также Азорских о-вов (фото Гуи Менезес (Gui Menezes)).

Анализ вариаций окраски проводили на основании изучения свежельвовленных особей (САХ), их описаний из опубликованной литературы, рисунков (воды Новой Зеландии) или фотографий (воды Канарских и Азорских о-вов, СВА и СЗА) и фиксированных экземпляров из музейных коллекций (СВА).

Особенности полового созревания ската Ричардсона не изучены, а о размерах, при которых он созревает, ничего не известно. Основываясь на опубликованных сведениях, а также данных о соотношении длины птеригоподиев и ниж-

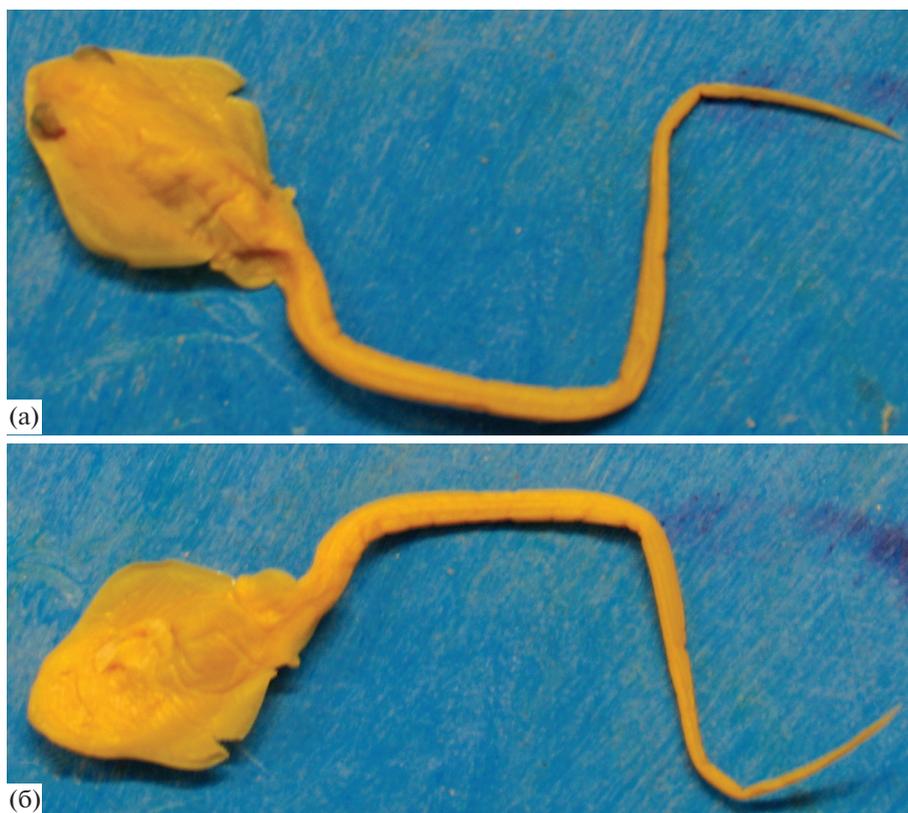


Рис. 1. Ранний эмбрион ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 14 см (BMNH 1999.2.2.4): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона.

ней лопасти V (Орлов, 2006) у исследованных самцов, можно заключить, что длина эмбрионов составляет 14–25 см, неполовозрелых – 35–69 см, созревающих – 78–85 см и половозрелых – выше 113 см. При этом длина, при которой созревают самцы и самки крупных северо-тихоокеанских и южно-африканских скатов, практически не различается, а половая зрелость наступает при достижении 60% максимальной длины (Орлов, 2006; Ebert et al., 2007; Орлов, Смирнов, 2015). В связи с этим, в дальнейшем при обсуждении полученных результатов для обозначения степени половой зрелости особей ската Ричардсона в исследованном размерном ряду мы условно выделяем следующие группы: эмбрионы – 18–25 см, неполовозрелые – 29–69 см, созревающие и половозрелые – 78–105 см, половозрелые – выше 105 см (последняя составляет 60% от максимально известной длины).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа представлены в табл. 1, включающей 13 признаков – особенностей окраски. В анализ не включен ранний эмбрион длиной 142 мм BMNH 1999.2.2.4 (рис. 1), который был окрашен одноцветно и не имел характерных

для вида особенностей окраски как в свежем (Stehmann, Merrett, 2001), так и фиксированном состоянии (наши данные). Описание окраски проиллюстрировано фотографиями скатов, представляющих размерный ряд 14, 18, 25, 35, 52, 69, 84, 106 и 127 см (рис. 1–9).

Дорсальная сторона тела

Вариации окраски дорсальной поверхности ската Ричардсона в сравнении с таковыми вентральной можно рассматривать как незначительные. Для всех исследованных особей данного вида (без учета экземпляров, у которых по отдельным признакам данные отсутствовали) независимо от их размера, пола и состояния половой зрелости была характерна однотонная окраска дорсальной стороны от пепельной до коричневой (см. табл. 1). Подавляющее большинство особей на дорсальной поверхности диска имело более темную кайму по его краю и на нижних лопастях V (96.4%), а также небольшие светлые точки или пятна (96.4%) (рис. 2). Исключение в этом отношении представляла самка длиной 110 см (№ 22 в табл. 1) из вод Канарских о-вов (Brito et al., 1998), у которой (судя по фото) оба рассматриваемых признака отсутствовали.

Вентральная сторона тела

Вариации окраски вентральной стороны ската Ричардсона были более разнообразны. У всех исследованных скатов без исключения независимо от длины, пола и половой зрелости вентральная сторона в целом была пепельно-коричневой. При этом она была обычно темнее дорсальной, а на краях крыльев и нижних лопастей *V* имелась темная кайма. Также все исследованные особи характеризовались наличием белых участков вокруг рта, ноздрей и от ноздрей до углов рта (рис. 3). У подавляющего большинства особей (92.3%) отверстие клоаки было белым (см. рис. 3), за исключением двух эмбрионов длиной 18 и 22 см (№ 1 и 2, в табл. 1 и рис. 46, 66). Нижняя сторона хвоста была полностью белой у 2 эмбрионов – самки *TL* 18 см и самца *TL* 35 см (№ 1 и 6 соответственно). У прочих особей низ хвоста в разной степени пигментирован (до полностью темного – рис. 3 и 5); причем у некоторых из них у его основания имелся белый участок (рис. 46, 6). Около трети исследованных экземпляров (35.7%) характеризовались наличием светлых пятен на хвосте (рис. 8б), за исключением уже упоминавшихся выше двух особей, у которых хвост с вентральной стороны был полностью белый.

У 73.1% особей белый участок отмечен в месте соединения *P* и *V* плавников (рис. 3, 46, 66, 76, 86, 96), за исключением семи самок и самцов длиной от 29 до 146 см (рис. 56). У несколько большего числа особей (76.9%) белые участки отмечены на нижних лопастях *V* (рис. 46, 96), за исключением шести самок и самцов длиной от 69 до 113 см (рис. 56, 86). Чуть больше трети исследованных экземпляров длиной до 69 см имели белые пятна на брюхе (рис. 8б), форма, расположение и размеры которых варьировали. У эмбрионов длиной 18, 22 и 24 см сохранились светло окрашенные участки на месте желточного мешка (рис. 46, 96), а также имелись дополнительные светлые участки вокруг жаберных щелей (рис. 96). У эмбриона длиной 24 см (№ 3) имелись дополнительные светлые участки, образующие фигуру стреловидной формы, с вершиной у места прикрепления желточного мешка и основанием у нижних лопастей *V* (рис. 96). У самца длиной 35 см (№ 6) белое пятно отмечено между пятыми жаберными щелями (рис. 66). У самца длиной 69 см (№ 14) белое пятно находилось на уровне между вторыми и пятыми жаберными щелями (рис. 76). Кроме того, у 80.0% самцов имелись белые участки на птеригоподиях (рис. 3, 46, 56, 66, 76), за исключением экземпляров длиной 53, 69 и 78 см (№ 10, 14, 16).

Особенности окраски различных размерных групп

В целом, независимо от размера и пола (за исключением эмбриона *TL* 14 см) все исследован-

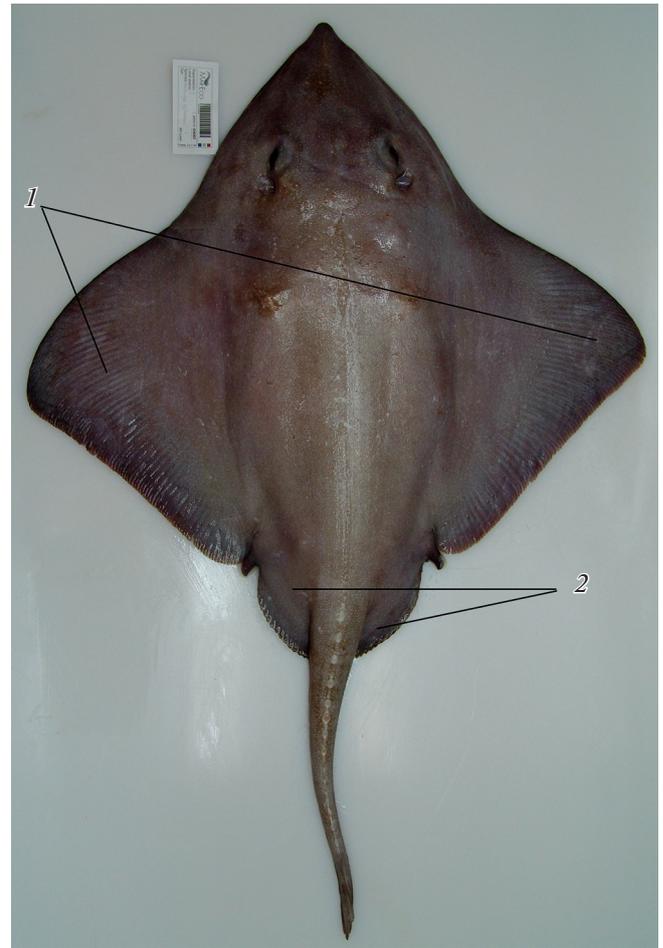


Рис. 2. Дорсальная сторона крупной самки ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 106 см (ZMUB 19476): 1 – грудные плавники (крылья), 2 – нижние лопасти *V*.

ные особи имели однотонную от пепельной до коричневой окраску дорсальной стороны с незначительными вариациями в виде наличия у некоторых экземпляров более темной каймы по краям *P* и *V*, а также мелких точек и пятен на диске. Вариации окраски вентральной стороны тела были более значительными, хотя все изученные экземпляры характеризовались ее более темной окраской в сравнении с дорсальной стороной и наличием темной каймы на крыльях и нижних лопастях *V*.

Эмбрионы. Наши детальные исследования изученных ранее Штеманом и Мерреттом (Stehmann, Merrett, 2001) эмбрионов в фиксированном состоянии (№ 1–4 табл. 1) выявили некоторые дополнительные особенности их окраски. Эмбрион длиной 14 см имел одноцветную бледную окраску как в фиксированном, так и свежесвыловленном состоянии (Stehmann, Merrett, 2001). У двух других эмбрионов *TL* 18 см (№ 1) и 22 см (№ 2) от-

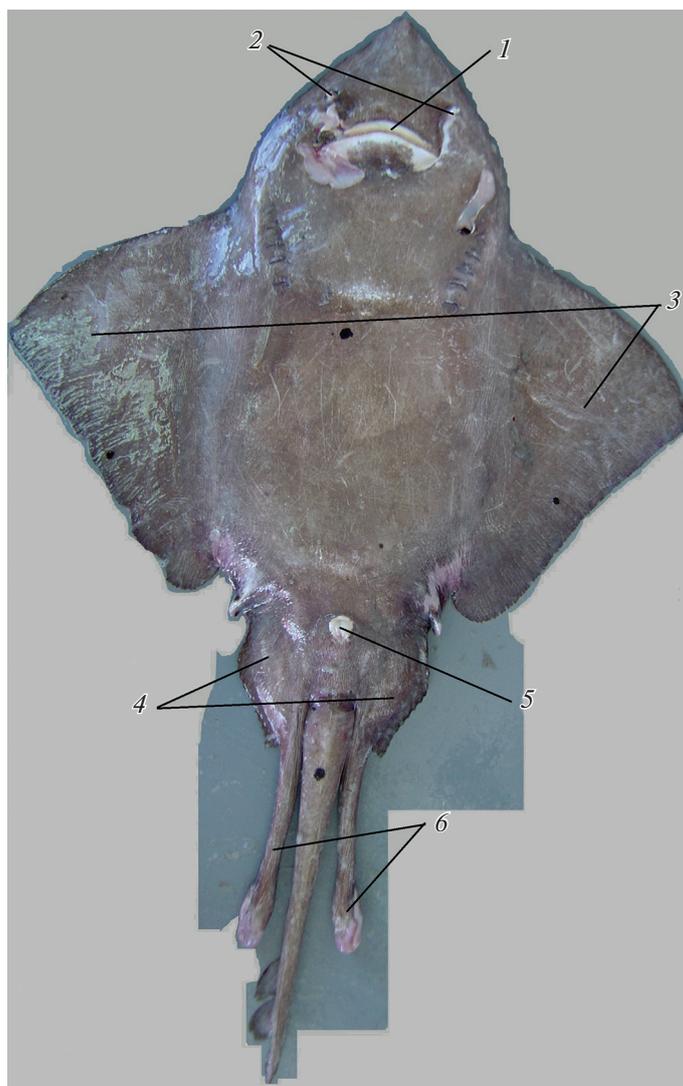


Рис. 3. Вентральная сторона половозрелого самца ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 127 см из вод Азорских о-вов (фото Гуи Менезес): 1 – рот, 2 – ноздри, 3 – крылья (грудные плавники), 4 – нижние лопасти *V*, 5 – клоака, 6 – птериподии).

существовало белое пятно у входа в клоаку. У первого из указанных экземпляров, кроме того, вся нижняя поверхность хвоста была белой, в отличие от большинства экземпляров, у которых светлый участок отмечен только у основания хвоста. У четырех из рассматриваемых экземпляров имелись белые пятна на брюхе различной конфигурации и местоположения, которые отсутствовали у скатов длиной свыше 85 см. Среди эмбрионов у всех самцов дорсальная поверхность птериподиев была светлой.

Неполовозрелые экземпляры. Согласно полученным нами данным, у всех неполовозрелых особей отмечено наличие белых участков вокруг рта, ноздрей, у входа в клоаку и у основания хвоста. В то же время, некоторые особенности их окраски заметно отличались от таковой созревающих и половозрелых экземпляров. Так, у неко-

торой части особей *TL* 29–69 см (4 из 11 экз.) отсутствовал белый участок между *P* и *V* при наличии его у всех особей меньшей длины и большинства более крупных экземпляров. У двух скатов длиной 69 см (№ 14 и 15) не отмечено белых участков на нижних лопастях *V*. У четырех особей *TL* 52–55 см (№ 8–11) и 69 см (№ 14) отсутствовали белые пятна на брюхе, присутствуя у большинства созревающих и половозрелых экземпляров. У скатов *TL* 55 см (№ 11) и 69 см (№ 14) не отмечено белых пятен на хвосте. У двух самцов *TL* 53 (№ 10) и 69 см (№ 14) отсутствовали белые участки на вершинах птериподиев, присутствуя у всех более мелких и большинства более крупных экземпляров.

Созревающие экземпляры. Для окраски вентральной стороны тела всех созревающих особей было характерно наличие белых участков вокруг рта, ноздрей и входа в клоаку. У одного из пяти

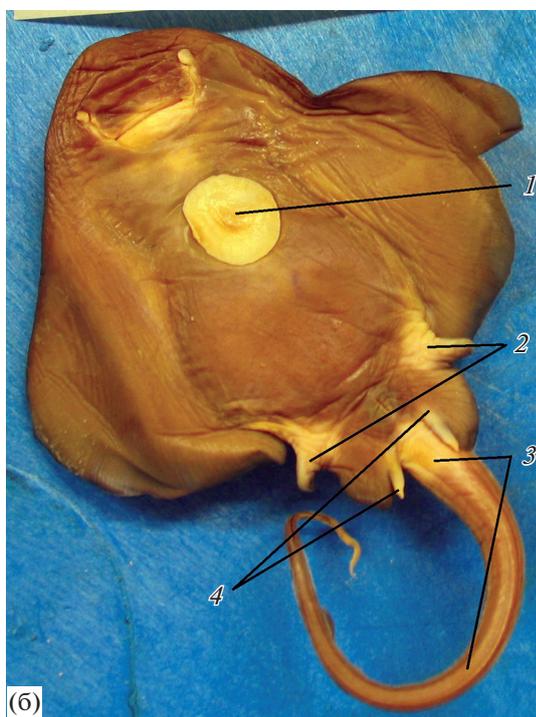


Рис. 4. Эмбрион ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 18 см (BMNH 1999.2.2.4): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона: 1 – остатки желточного мешка, 2 – белые участки на нижних лопастях *V*, 3 – светлая нижняя поверхность хвоста, 4 – белые участки на птеригоподиях.

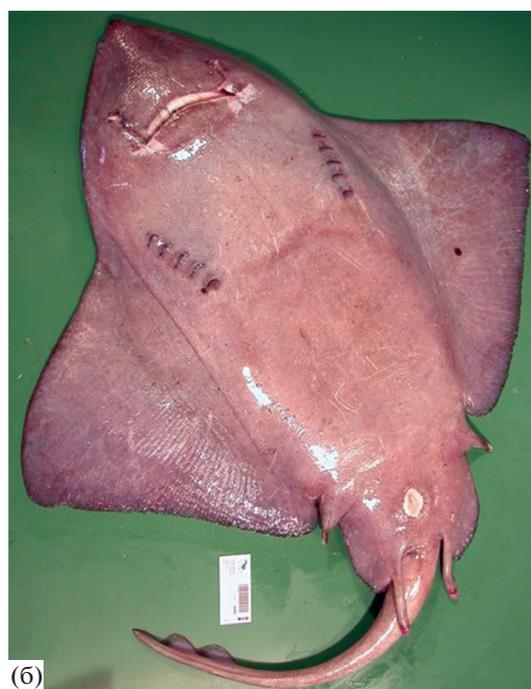
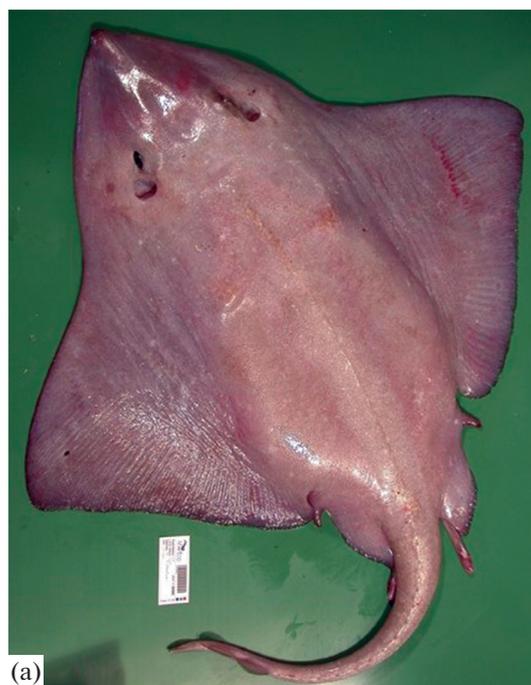


Рис. 5. Созревающий самец ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 84 см (ZMUB 19514-2): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона.

исследованных экземпляров (№ 16) отсутствовало белое пятно между *P* и *V*. У трех из пяти особей (№ 16–17 и 19) не отмечено белых участков на нижних лопастях *V*. У всех созревающих экземпляров отсутствовали белые пятна на брюхе, за исключением самца *TL* 84 см (№ 17). У всех скатов рассматриваемой группы отсутствовали бе-

лые пятна на хвосте. Из двух изученных созревающих самцов (№ 16 и 17) лишь у одного вершины птеригоподиев были окрашены светло.

Половозрелые экземпляры. Как и подавляющее большинство особей других размерных групп, у половозрелых экземпляров отмечены белые участки вокруг рта и ноздрей и у входа в клоаку.



Рис. 6. Неполовозрелый самец ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 35 см (MNHN 1999-1156): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона.

Белые участки у основания хвоста имелись у трех из семи (№ 21, 23–24) изученных скатов. Наличие белых участков между *P* и *V* отмечено у двух (№ 23 и 28) из семи экземпляров. Нижние лопасти *V* были окрашены светло только у одной особи (№ 23). Белые пятна на брюхе и нижней поверхности хвоста ни у одного половозрелого ската не отмечены. При этом у всех изученных самцов данной груп-

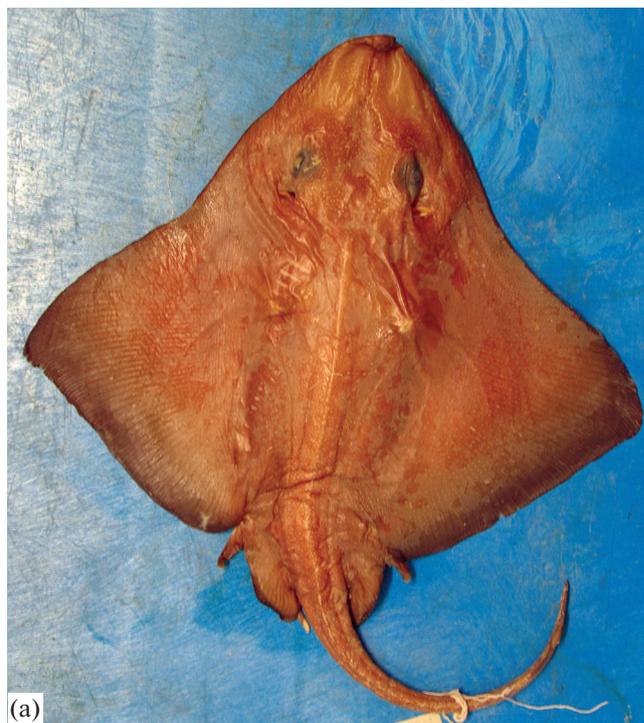


Рис. 7. Неполовозрелый самец ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 69 см (BMNH 1999.10.1.2): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона.

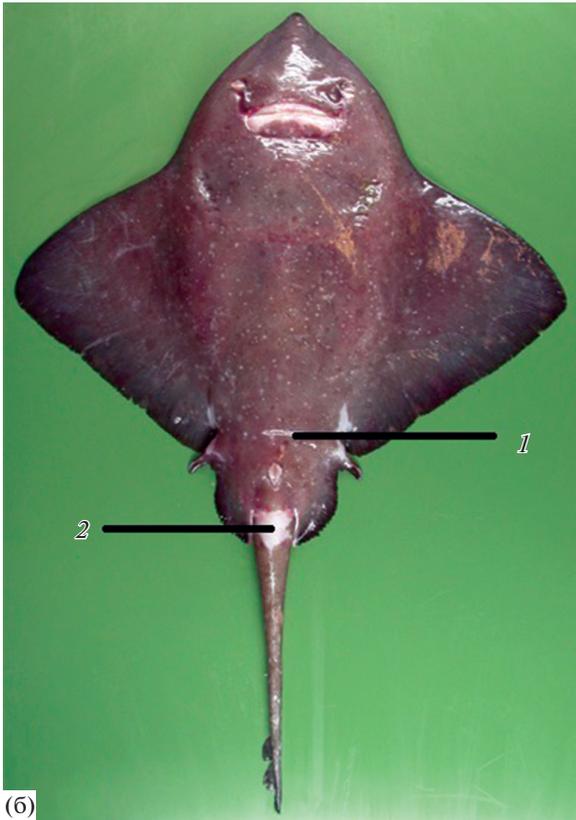
пы вершины птеригоподиев были светло окрашенными.

Вариации окраски в зависимости от пола

Анализ вариаций окраски вентральной стороны тела 14 самок и 12 самцов ее принципиальных различий у особей разных полов не выявил. От-



(a)



(б)

Рис. 8. Неполовозрелая самка ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 53 см (ZMUB 19522-2): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона: 1 – пятно на брюхе, 2 – белый участок у основания хвоста.



(a)



(б)

Рис. 9. Эмбрион ската Ричардсона *Bathyraja richardsoni* длиной 24 см (BMNH 1999.2.2.3): а – дорсальная сторона, б – вентральная сторона: 1 – белые участки в районе жаберных щелей, 2 – светлый участок стреловидной формы.

существование белого участка у входа в клоаку отмечено у двух наиболее мелких разнополых эмбрионов (№ 1 и 2). Белые участки у основания хвоста отсутствовали у одной крупной самки (№ 21) и четырех самцов TL 78–127 см (№ 16, 17, 23–24). Не было белых участков между P и V у трех самок TL 29, 45 и 146 см (№ 5, 7, 28) и 4 самцов TL 55, 69, 78, 113 см (№ 11, 14, 16, 23). Белые участки на ниж-

них лопастях *V* не отмечены у двух самок *TL* 69 и 101 см (№ 15 и 19) и четырех самцов *TL* 69–113 см (№ 14, 16–17, 23). Белые пятна на брюхе отсутствовали у восьми самок *TL* 53 и >85 см, в то время как среди самцов данный признак не был выражен у экземпляров *TL* 52–78 см и 113–130 см. Белые пятна на хвосте отсутствовали у семи самок *TL* > 85 см и семи самцов >55 см.

Вариации окраски в зависимости от глубины

У особей ската Ричардсона, пойманных на различных глубинах в диапазоне 1541–2951 м, отмечены некоторые различия особенностей окраски вентральной стороны тела. При их анализе указанный диапазон был разделен на три отрезка: 1541–1975 м (8 особей), 2125–2441 м (13 особей) и 2534–2951 м (5 особей). Скаты, у которых отсутствовали белые участки у входа в клоаку, обнаружены только на глубинах <2000. Белые участки у основания хвоста отсутствовали у двух экземпляров с глубин <2000 м и у трех – с глубин 2000–2500 м, но не отмечены у особей с глубин >2500 м. Белые участки между *P* и *V* отсутствовали у двух скатов, пойманных на глубине <2000 м, четырех – с глубин 2000–2500 м и одного с глубин >2500 м. На нижних лопастях *V* белые участки не обнаружены у трех особей с глубин <2000 м, двух – с глубин 2000–2500 м и одной с – глубин >2500 м. Белых пятен на брюхе не было у двух экземпляров, добытых на глубинах <2000 м, у десяти – на глубинах 2000–2500 м и у четырех – на глубинах >2500 м. Белые пятна на хвосте отсутствовали у трех особей с глубин <2000 м, у восьми – с глубин 2000–2500 м и у трех – с глубины >2500 м. Отсутствие белых вершин птеригоподиев обнаружено только у двух самцов с глубин менее 2000 м и одного с глубин свыше 2500 м.

Вариации окраски в зависимости от района

Небольшой объем материалов из вод Новой Зеландии (1 экз.) и СЗА (2 экз.) не позволяют их использовать в сравнительном анализе. Более объемные выборки из вод СВА (9 экз.), САХ и Азорских о-вов (14 экз.) предоставляют возможность сравнения окраски вентральной стороны тела рассматриваемого вида в указанных районах. Особи, у которых отсутствовал белый участок у входа в клоаку (2 экз.), отмечены только в СВА. Отсутствие белого участка у основания хвоста было более характерно для скатов из вод САХ (4 экз.), нежели СВА (1 экз.). Также у особей из вод САХ чаще отсутствовали белые участки между *P* и *V* (4 экз.) в сравнении с СВА (2 экз.), а также – на нижних лопастях *V* – 5 и 1 экз. соответственно. Белых пятен на брюхе не отмечено у 10 скатов из вод САХ и трех из СВА. Отсутствие белых пятен на хвосте отмечено у девяти особей из вод САХ и

двух – из СВА. Попутно отметим, что у всех изученных нами скатов из вод Новой Зеландии и СЗА также не было белых пятен на брюхе и хвосте. Наличие белых вершин птеригоподиев отмечено только у трех самцов из вод САХ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Имеющиеся в литературе сведения об окраске ската Ричардсона ограничиваются описанием таковой эмбрионов (Stehmann, Merrett, 2001) и взрослых половозрелых особей (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973a; Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Данные об особенностях окраски неполовозрелых и созревающих особей данного вида в опубликованных источниках до сих пор отсутствовали за исключением самки из района САХ (Orlov, 2011), имеющей некоторые аномалии во внешнем строении и окраске. Таким образом, имеющиеся до сих пор в литературе сведения не давали возможности описать онтогенетические изменения окраски ската Ричардсона в полном объеме, хотя упоминания о наличии таковых в опубликованной ранее литературе встречались (Orlov, Cotton, 2011).

Описывая окраску извлеченных из яйцевых капсул эмбрионов *TL* 14–25 см, Штеман и Мерретт (Stehmann, Merrett, 2001) отмечали, что она в целом соответствует таковой взрослых особей, но у первых окраска дорсальной и вентральной сторон отличаются сильнее в сравнении с последними. При этом у эмбрионов нижняя поверхность окрашена заметно темнее, в то время как у взрослых различия окраски дорсальной и вентральной сторон выражены не столь отчетливо. Наши исследования окраски фиксированных эмбрионов не обнаружили заметных различий между дорсальной и вентральной сторонами, однако обнаружили дополнительные особенности последней, на которые не было обращено внимания ранее и которые отсутствуют у взрослых особей.

Об особенностях окраски среднеразмерных скатов Ричардсона (неполовозрелых и созревающих) до сих пор сведения отсутствовали. Полученные нами данные по окраске среднеразмерных скатов Ричардсона значительно дополняют имеющиеся сведения и позволяют проследить онтогенетические изменения окраски рассматриваемого вида в полном объеме.

Сведений об окраске взрослых половозрелых особей ската Ричардсона в опубликованной литературе достаточно (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973a; Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Основная окраска дорсальной стороны, согласно нашим данным, принципиально ничем не отличалась от описанной ранее (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973a; Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Наличие на дорсаль-

ной стороне небольших светлых точек или пятен, а также темной каймы на краях диска и нижних лопастях *V* отмечены и нами у большинства проанализированных особей, за исключением самки длиной 110 см (№ 22) из вод Канарских о-вов (Brito et al., 1998). О наличии белых участков вокруг рта и ноздрей сообщали многие авторы (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973b). Наши данные в отношении крупных скатов полностью соответствуют указанным наблюдениям.

Результаты проведенного нами анализа позволяют существенно уточнить отдельные особенности окраски вентральной поверхности крупных экземпляров ската Ричардсона. Наличие белого участка у основания хвоста отмечено целым рядом авторов (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973b; Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Однако при этом одни авторы указывают на наличие белого участка у основания хвоста, другие — на наличие белых полос (пятен) на хвосте. По нашим данным, оба указанных признака следует рассматривать как независимые. Наличие белого участка у основания хвоста характерно не для всех крупных скатов, поскольку он не обнаружен у особей длиной 106–127 см (№ 21, 23–24), а белые пятна на хвосте зарегистрированы преимущественно у молодых экземпляров.

Наличие пятна у входа в клоаку ранее отмечалось рядом авторов (Garrick, 1961; Forster, 1965; Tempelman, 1973b). Согласно нашим данным, данный признак характерен для окраски всех крупных скатов рассматриваемого вида.

Еще один признак, который характерен для окраски взрослых скатов Ричардсона — наличие белого участка между *P* и *V* (Garrick, 1961; Tempelman, 1973b). По нашим данным, данный признак отсутствовал у самца длиной 113 см (№ 23) и самки длиной 146 см (№ 28).

Некоторые авторы (Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013) обращают внимание на наличие белых участков на нижних лопастях *V*. Среди крупных особей, изученных нами, данный признак отсутствовал только у самки длиной 101 см (№ 19) и самца длиной 113 см (№ 23).

На наличие белых участков вокруг жаберных щелей, которые на приведенных изображениях практически не видны, указывали немногие авторы (Garrick, 1961; Tempelman, 1973b). Только на рисунке голотипа (Garrick, 1961) отчетливо видны узкие белые участки вокруг жаберных отверстий. Нашими исследованиями наличие белых участков вокруг жаберных щелей у исследованных крупных экземпляров не выявлено.

Еще одним признаком, характерным для крупных самцов ската Ричардсона, являются белые вершины птеригоподиев (Tempelman, 1973b). Наши исследования показали, что данный при-

знак хорошо выражен у крупных (длиной свыше 84 см) самцов.

Последний признак окраски крупных особей, который упоминается в опубликованной литературе, — это светлые участки, расположенные вдоль срединной линии тела (Sulak et al., 2009; Ebert, Stehmann, 2013). Что из себя представляют данные участки, в указанных источниках не объясняется. Мы предполагаем, что речь в данном случае может идти о белых пятнах на брюхе в центральной части диска, которые, по нашим данным, у особей различной длины могут иметь разные местоположение и конфигурацию (см. выше), а также о белых участках у основания хвоста и вдоль него.

Таким образом, анализ литературных и собственных данных показывает, что отдельные признаки окраски ската Ричардсона сохраняются у него на протяжении всего жизненного цикла и практически не зависят от размера, пола, глубины и района. К ним относятся цвет обеих сторон тела, наличие светлых точек или пятен на дорсальной поверхности диска, наличие темной каймы на крыльях и нижних лопастях *V* с обеих сторон тела, белые участки вокруг рта и ноздрей.

Практически у всех особей ($TL > 24$ см) имеется белый участок у входа в клоаку, отсутствуя у лишь самых мелких эмбрионов (№ 1–2). У большей части особей имеется белый участок у основания хвоста, отсутствуя у нескольких созревающих (№№ 16–17) и половозрелых (№ 21, 23–24). Среди неполовозрелых скатов, в отличие от эмбрионов, появляются экземпляры (№ 5, 7, 11, 14), у которых отсутствует белый участок между *P* и *V*, что изредка отмечается также у созревающих (№ 16) и половозрелых (№ 23, 28) скатов. Белые участки на нижних лопастях *V* исчезают у неполовозрелых особей $TL > 69$ см (№ 14–15), что отмечено также у большей части созревающих (№ 16–17, 19) и одного половозрелого экземпляра (№ 23). Белые пятна на брюхе исчезают у неполовозрелых особей $TL > 52$ см (исключение № 13 TL 63 см) и не обнаруживаются как среди созревающих (№ 17 TL 84 см), так и половозрелых скатов. Белые пятна на хвосте характерны только для молодых экземпляров, они исчезают при $TL > 55$ см и не отмечаются у созревающих и половозрелых особей (исключение № 14 TL 69 см). Наличие белых участков на птеригоподиях характерны для большинства изученных самцов за исключением двух неполовозрелых (№ 10, 14) и одного созревающего (№ 16) экземпляров. На протяжении жизненного цикла данный признак подвержен существенным изменениям: если у эмбрионов и неполовозрелых самцов вентральная поверхность птеригоподиев целиком светлая, то у созревающих и половозрелый экземпляров окрашенными светло остаются только вершины птеригоподиев.

В целом, по окраске самцы и самки ската Ричардсона принципиально друг от друга не отличались. Однако можно выделить четыре признака, по которым окраска особей разных полов имела заметные различия: белый участок у основания хвоста (92.9% у самок против 66.7% у самцов), белый участок между *P* и *V* (78.6% против 66.7%), белый участок на нижних лопастях *V* (85.8% против 66.7) и белое пятно на брюхе (42.9% против 33.3%). Следует отметить, что рассматриваемые четыре признака у особей разных полов проявлялись по-разному. Если белый участок у основания хвоста имелся у всех самок (исключение № 21 *TL* 106 см), то он не отмечен у всех крупных самцов *TL* > 78 см (исключение № 25 *TL* 130 см). Практически у все крупные самки *TL* > 103 см имели белые участки на нижних лопастях *V* (без исключения) и между *P* и *V* (исключение № 28 *TL* 146 см), в то время как у более половины крупных самцов *TL* > 55 см (57.1%) эти признаки не были выражены. Наличие белых пятен на брюхе отмечалось преимущественно среди молодых экземпляров обоих полов. Можно предположить, что обнаруженные различия в окраске крупных самцов и самок, призваны облегчить поиск полового партнера в условиях низкой численности вида в условиях полного отсутствия света.

Принципиальных различий особенностей окраски ската Ричардсона в зависимости от глубины выявить не удалось. Можно лишь отметить, что эмбрионы, у которых отсутствовали белые участки у входа в клоаку, отмечены лишь на глубинах <2000 м. Вероятно, это связано с тем, что подобных находок на других глубинах пока нет. Среди скатов, пойманных на глубине >2500 м, не отмечено особей, у которых отсутствовал белый участок у основания хвоста. Белые участки на вершинах птеригоподиев имелись у всех скатов, пойманных на глубинах 2000–2500 м, в отличие от экземпляров с большими и меньшими глубинами. Наличие или отсутствие остальных изученных признаков отмечено у особей не зависимо от глубины поимки. Скорее всего, обнаруженные различия окраски на разных глубинах носят случайный характер, поскольку у рассматриваемого вида, в отличие от других глубоководных скатов, например, северо-тихоокеанских (Orlov et al., 2006b), онтогенетические вертикальные миграции не выражены, и размеры особей с глубиной не связаны (Orlov et al., 2006a).

Принципиальные различия в окраске ската Ричардсона в разных районах не обнаружены. Тем не менее, по некоторым признакам особи из вод САХ и СВА различались. Так частота встречаемости составила, соответственно, 71.4 и 88.9% для белых участков у основания хвоста, 64.3 и 77.8% — для белых участков между *P* и *V*, 64.3 и 88.9% — для белых участков на нижних лопастях *V*, 28.6 и 66.7% — для белых пятен на брюхе, 28.6 и

77.8% — для белых пятен на хвосте, 50 и 100% — для белых вершин птеригоподиев. Объяснить причины обнаруженных географических различий в окраске особей ската Ричардсона пока не представляется возможным. Однако имеются сведения о специфике окраски в водах САХ и СВА и других глубоководных скатов, например, ската Йенсена *Amblyraja jenseni*, бледного ската *Bathyrāja pallida* и ската Кукуева *Rajella kukujevi* (Orlov, Cotton, 2013, 2015; Orlov, 2014).

Окраска свежевывловленных и фиксированных в формалине особей ската Ричардсона несколько различается, хотя и незначительно. Гаррикс (Garrick, 1961) указывал, что после фиксации в формалине окраска особей становится несколько темнее. Темплман (Tempelman, 1973b) полагал, что после фиксации половина особей не меняет свою окраску, а у половины становится темнее вентральная поверхность, особенно по краям диска. Наши результаты показали, что после фиксации интенсивность окраски дорсальной и вентральной сторон эмбрионов практически не различается. Наши исследования глубоководных североатлантических скатов (Orlov, Cotton, 2013, 2015; Orlov, 2014; настоящее сообщение), основанные на изучении как свежевывловленных, так и фиксированных образцов, показывают, что и те, и другие вполне пригодны для анализа особенностей их окраски.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в данной статье и ранее опубликованные сведения о наличии видоспецифической окраски вентральной стороны у глубоководных североатлантических скатов ставят закономерный вопрос о ее биологическом смысле у видов, обитающих в условиях перманентного отсутствия света. По нашему мнению, данный феномен является эволюционным приобретением, направленным на облегчение поиска полового партнера в условиях низкой численности. Известно, что спариванию у различных видов надотряда *Batoidea* предшествует наплывание одного партнера над другим с последующим захватом самцом челюстями края крыла самки (Tricas, 1980; Luer, Gilbert, 1985; Yano et al., 1999; Chapman et al., 2003). Как происходит процесс спаривания у глубоководных скатов, неизвестно, но вряд ли он принципиально отличается от описанного выше. В условиях полной темноты и низкой численности успешность каждой попытки спаривания имеет высокое значение для выживания вида. Поэтому репродуктивный успех во многом зависит от коррелятивной видовой идентификации партнерами друг друга. Вероятно, видоспецифические особенности окраски вентральной стороны тела глубоководных скатов служат своеобразным маркером в системе опознавания “свой–чужой”, что

позволяет половым партнерам безошибочно определять не только принадлежность к одному виду, но и готовность к спариванию. Данная гипотеза вызывает закономерный вопрос о том, каким образом половые партнеры различают рисунок на вентральной поверхности тела? Известно, что различные виды скатообразных (Rajiformes) способны издавать слабоэлектрические сигналы (Varon et al., 1992; Барон, 1994; New, 1994; Sinceros et al., 1998; Sinceros, Tricas, 2002), используя их в том числе и для поиска полового партнера (Tricas et al., 1995). Можно предположить, что и глубоководные скаты в поисках подходящего объекта для спаривания используют аналогичный механизм, который позволяет им различать особенности рисунка на вентральной стороне тела. Однако не следует исключать и роль зрения в этом процессе, поскольку наличие зрительного пигмента в глазах глубоководных видов, включая ската Ричардсона (Douglas et al., 1995; Lisney et al., 2012), свидетельствуют о том, что оно в жизни рассматриваемого вида играет не последнюю роль.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне признательны своим коллегам Ингвару Бирчедалу (Ingvar Birkedal, Zoological Museum, University of Bergen, Bergen, Norway), Патрику Кэмпбеллу и Роберто Мигуес (Patrick Campbell and Roberto Miguez, British Museum of Natural History, London, Great Britain), Бернару Сере и Ромэну Коссе (Bernard Séret and Romain Causse, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France), которые сделали возможным исследование коллекционных материалов и предоставили для этого помещения и оборудование. Чарльз Коттон (Charles Cotton, Savannah State University, Savannah, USA) оказал помощь в измерениях экземпляров ZMUB. Гуи Менезес (Gui Menezes, Departamento de Oceanografia e Pescas, Universidade dos Açores, Horta, Portugal) предоставил фотографии экземпляров из вод Азорских о-вов. Всем перечисленным коллегам авторы выражают глубокую благодарность. Также они благодарны анонимным рецензентам за ценные замечания и предложения, которые позволили существенно улучшить качество статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Подготовка данной работы выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ № 0128-2021-0008.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Орлов А.М.: сбор первичных данных, формирование базы данных, формулирование идеи, написание рукописи; Рабазанов Н.И.: разработка методики обработки данных, интерпретация результатов, редактирование рукописи; Никифоров А.И.: анализ данных, подготовка и редактирование иллюстраций, редактирование рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барон В.Д. Возможная роль электрорецепции в поведении морских слабоэлектрических скатов *Raja clavata* (Rajidae) // Сенсор. сист. 1994. Т. 8. № 3–4. С. 147–161.
- Орлов А.М. Итоги совещания специалистов ФАО и Всемирного фонда охраны природы “Сохранение и управление промыслом глубоководных видов хрящевых рыб” // Биология моря. 2005. Т. 31. № 1. С. 68–70.
- Орлов А.М. К обоснованию промысловой меры дальневосточных скатов (сем. Rajidae) на примере массовых западноберинговоморских видов // Тр. ВНИРО. 2006. Т. 146. С. 252–264.
- Орлов А.М. Красный список Международного союза охраны природы и природоохранный статус хрящевых рыб западной части Северной Пацифики // Вопр. ихтиологии. 2008. Т. 48. № 4. С. 575–576.
- Орлов А.М., Литвинов Ф.Ф. Международные усилия по оценке природоохранного статуса хрящевых рыб Мирового океана // Тр. ВНИРО. 2010. Т. 149. С. 92–114.
- Орлов А.М., Смирнов А.А. Новые данные о половом диморфизме и репродуктивной биологии щитоносного ската *Bathyraja parmifera* в северо-западной части Тихого океана // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. № 5. С. 614–627.
- Орлов А.М., Шеверницкий Д.А. Природоохранный статус хрящевых рыб Северо-Восточной Атлантики // Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы. Отд. биол. 2008. Т. 113. Вып. 4. С. 27–32.
- Baron V.D., Sokolova L.S., Mikhailenko N.A. Identification of spinal electromotoneurons in the ray *Raja clavata* (Rajidae) // Neurosci. 1992. V. 48. № 2. P. 397–403.
- Brito A., Pascual-Alayón P.J., Rabanal R. et al. Peces cartilaginosos de Canarias. Los tiburones de los fondos profundos y su aprovechamiento pesquero. Santa Cruz de Tenerife: Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de Canarias, 1998. 171 p.
- Cavanagh R.D., Gibson C. Overview of the Conservation Status of Cartilaginous Fishes (Chondrichthyans) in the Mediterranean Sea. Gland, Switzerland and Malaga,

- Spain: IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group, 2007. 42 p.
- Chapman D.D., Corcoran M.J., Harvey G.M. et al. Mating behavior of southern stingrays, *Dasyatis americana* (Dasyatidae) // Environ. Biol. Fish. 2003. V. 68. № 3. P. 241–245.
- Douglas R.H., Partridge J.C., Hope A.J. Visual and lenticular pigments in the eyes of demersal deep-sea fishes // J. Compar. Physiol. A. 1995. V. 177. № 1. P. 111–122.
- Dulvy N.K., Reynolds J.D. Predicting extinction vulnerability in skates // Conserv. Biol. 2002. V. 16. № 2. P. 440–450. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00416.x>
- Ebert D.A., Compagno L.J., Cowley P.D. Aspects of the reproductive biology of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei) from southern Africa // ICES J. Mar. Sci. 2008. V. 65. № 1. P. 81–102. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm169>
- Ebert D.A., Stehmann M.F.W. Sharks, batoids and chimaeras of the North Atlantic // FAO Spec. Catalogue Fish. Purpose. № 7. Rome: FAO, 2013. 523 p.
- Forster G.R. *Raja richardsoni* from the continental slope off south-west England // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1965. V. 45. P. 773–777. <https://doi.org/10.1017/S0025315400016581>
- Fossen I., Cotton C.F., Bergstad O.A., Dyb J.E. Species composition and distribution patterns of fishes captured by longlines on the Mid-Atlantic Ridge // Deep-Sea Res. II. 2008. V. 55. P. 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.09.004>
- Garrick J.A.F. Studies on New Zealand Elasmobranchii. Part XIII. A new species of *Raja* from 1,300 fathoms // Trans. R. Soc. N.Z. 1961. V. 88. Pt. 4. P. 743–748.
- Garrick J.A.F., Paul L.J. The taxonomy of New Zealand skates (suborder Rajoidea), with descriptions of three new species // J. R. Soc. N.Z. 1974. V. 4. Iss. 3. P. 345–377. <https://doi.org/10.1080/03036758.1974.10419402>
- Goodwin H.B. Skate and ray management in the Northwest Atlantic: an overview of current management and recommendations for conservation. MS Thesis. Halifax: Dalhousie University, 2012. 114 p.
- Kulka D.W., Orlov A., Barker A.S. *Bathyrāja richardsoni*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2015: e.T63127A70709214. Downloaded on 19 May 2020. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T63127A70709214.en>
- Lisney T.J., Theiss S.M., Collin S.P., Hart N.S. Vision in elasmobranchs and their relatives: 21st century advances // J. Fish Biol. 2012. V. 80. № 5. P. 2024–2054. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03253.x>
- Luer C.A., Gilbert P.W. Mating behavior, egg deposition, incubation period, and hatching in the clearnose skate, *Raja eglanteria* // Environ. Biol. Fish. 1985. V. 13. № 3. P. 161–171.
- New J.G. Electric organ discharge and electrosensory reafference in skates // Biol. Bull. 1994. V. 187. № 1. P. 64–75.
- Orlov A.M. Record of tailless Richardson's ray *Bathyrāja richardsoni* (Garrick, 1961) (Rajiformes: Arhynchobatidae) caught off the Mid-Atlantic ridge // Pan-Am. J. Aquat. Sci. 2011. V. 6. № 3. P. 232–236.
- Orlov A.M. New data on rare deep-water Mid-Atlantic skate *Rajella kukujevi* (Rajidae) // J. Ichthyology. 2014. V. 54. № 5. P. 317–337. <https://doi.org/10.1134/S0032945214030102>
- Orlov A.M., Cotton C.F. Sexually dimorphic morphological characters in five North Atlantic deepwater skates (Chondrichthyes: Rajiformes) // J. Mar. Biol. 2011. V. 2011. Art. ID 842821. 18 p. <https://doi.org/10.1155/2011/842821>
- Orlov A.M., Cotton C.F. New data on rare deepwater North Atlantic skate *Bathyrāja pallida* (Forster, 1967) (Arhynchobatidae, Rajiformes) // J. Ichthyology. 2013. V. 53. № 7. P. 465–477. <https://doi.org/10.1134/S0032945213040048>
- Orlov A.M., Cotton C.F. New data on the rare deep-sea skate *Amblyrāja jenseni* (Rajidae) from the North Atlantic Ocean // J. Ichthyology. 2015. V. 55. № 4. P. 478–496. <https://doi.org/10.1134/S0032945215040086>
- Orlov A., Cotton C., Byrkjedal I. Deepwater skates (Rajidae) collected during the 2004 cruises of R.V. “G.O. Sars” and M.S. “Loran” in the Mid-Atlantic Ridge area // Cybium. 2006. V. 30. № 4 (suppl.). P. 35–48.
- Orlov A., Tokranov A., Fatykhov R. Common deep-benthic skates (Rajidae) of the northwestern Pacific: basic ecological and biological features // Cybium. 2006. V. 30. № 4 (suppl.). P. 49–65.
- Orlov A.M., Cotton C.F., Shevernitsky D.A. Sexual dimorphism of external morphological characters in some deepwater skates (Rajidae, Rajiformes, Chondrichthyes) of the North Atlantic // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2010. V. 65. № 1. P. 40–44. <https://doi.org/10.3103/S0096392510010086>
- Porteiro F.M., Sutton T.T., Byrkjedal I. et al. Fishes of the Northern Mid-Atlantic Ridge collected during the MAR-ECO cruise in June-July 2004: an annotated checklist // Arquipelago. Life Mar. Sci. Suppl. 2017. Suppl. 10. iii + 126 p.
- Sisneros J.A., Tricas T.C., Luer C.A. Response properties and biological function of the skate electrosensory system during ontogeny // J. Comp. Physiol. A. 1998. V. 183. № 1. P. 87–99.
- Sisneros J.A., Tricas T.C. Ontogenetic changes in the response properties of the peripheral electrosensory system in the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) // Brain Behav. Evol. 2002. V. 59. № 3. P. 130–140.
- Stehmann M.F.W., Merrett N.R. First records of advanced embryos and egg capsules of *Bathyrāja* skates from the deep north-eastern Atlantic // J. Fish Biol. 2001. V. 59. P. 338–349. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00134.x>
- Sulak K.J., MacWhirter P.D., Luke K.E. et al. Identification guide to skates (Family Rajidae) of the Canadian Atlantic and adjacent regions // Can. Tech. Rept. Fish. Aquat. Sci. 2009. № 2850. 34 p.
- Tempelman W. The skate, *Raja richardsoni* Garrick, 1961, assigned to *Bathyrāja* // J. Fish. Res. Board Can. 1973a. V. 30. P. 1729–1732.

- Tempelman W.* First records, description, distribution, and notes on the biology of *Bathyraja richardsoni* (Garrick) from the Northwest Atlantic // *J. Fish. Res. Board Can.* 1973b. V. 30. P. 1831–1840.
- Tricas T.C.* Courtship and mating-related behaviors in myliobatid rays // *Copeia*. 1980. V. 1980. № 3. P. 553–556.
- Tricas T.C., Michael S.W., Sisneros J.A.* Electrosensory optimization to conspecific phasic signals for mating // *Neurosci. Letters*. 1995. V. 202. № 1–2. P. 129–132.
- Yano K., Sato F., Takahashi T.* Observations of mating behavior of the manta ray, *Manta birostris*, at the Ogasawara Islands, Japan // *Ichthyol. Res.* 1999. V. 46. № 3. P. 289–296.

Ontogenetic Changes in Coloration of Rare Deepwater Richardson's Ray *Bathyraja richardsoni* (Arhynchobatidae, Rajiformes, Chondrichthyes)

A. M. Orlov^{1–6, *}, N. I. Rabazanov^{4, 5}, and A. I. Nikiforov⁷

¹*Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences (IO RAS), Moscow, Russia*

²*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, Russia*

³*Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences (IPEE RAS), Moscow, Russia*

⁴*Dagestan State University (DGU), Makhachkala, Russia*

⁵*Tomsk State University, Tomsk, Russia*

⁶*Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (CIBR DFRC RAS), Makhachkala, Russia*

⁷*Moscow State Institute of International Relations (University) of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation (MGIMO), Moscow, Russia*

*e-mail: orlov@vniro.ru

The coloration features of the dorsal and ventral surfaces of the rare deep-sea Richardson's ray *Bathyraja richardsoni* (Arhynchobatidae) within the length range from 14 to 146 cm are studied and its ontogenetic changes are described. New data on the coloration of embryos, immature, maturing and sexually mature individuals are presented. It is shown that the coloration variations of the dorsal surface are insignificant, while the coloration of the ventral surface can vary significantly. The obtained data can be used in taxonomic and population studies, in the development of identification of species, in the preparation of faunistic overviews and regional guides, to facilitate the understanding of the features of coloration and its changes in deep-sea animals living in permanent darkness, as well as to expand knowledge about certain aspects of macro- and microevolution of deep-water skates.

Keywords: Richardson's ray *Bathyrjaja richardsoni*, coloration, ontogenetic changes, deep-water skates, North Atlantic

КАКИМ ОБРАЗОМ РАЗВИТИЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА КРЫСЫ СВЯЗАНО С ИЗМЕНЕНИЯМИ В ПУЛЕ ПРОТЕАСОМ?

© 2022 г. Н. С. Карпов^а, П. А. Ерохов^а, Н. П. Шарова^а*, Т. М. Астахова^а

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

*e-mail: npsharova@bk.ru

Поступила в редакцию 19.07.2021 г.

После доработки 04.08.2021 г.

Принята к публикации 11.08.2021 г.

Цель настоящей работы – исследовать, каким образом различные периоды раннего развития тонкого кишечника крысы связаны с изменениями в пуле протеасом. Показано, что к 21-му эмбриональному дню (Э21) и до 30-го дня постнатального развития (П30) на фоне постоянного количества протеасом изменяется их химотрипсинподобная и каспазаподобная активность, проявляемая субъединицами $\beta 5 + LMP7$ и $\beta 1 + LMP2$ соответственно, а также индивидуальная активность иммунных субъединиц LMP7 и LMP2. Причем выявлены как сходные характеристики, так и различия в динамике этих типов активности. Сходство проявляется в следующем. Во-первых, вся исследованная активность значительно повышается после Э18 и достигает максимума на П5–П15. Эти изменения соответствуют периоду ускоренного роста кишечника, заселения его микробиотой, развития адаптационных процессов и пищеварительной и иммунной функций. Во-вторых, сходство заключается в уменьшении всех исследованных типов активности к П22. Разница касается следующего. Во-первых, химотрипсинподобная и LMP7 активность падает к П22 в существенно меньшей степени по сравнению с каспазаподобной и LMP2 активностью. Во-вторых, к П30 (период изоляции от матери) только химотрипсинподобная и LMP7 активность вновь возрастает до максимальных уровней, что указывает на возможную ее роль в адаптации к внешнему питанию. Период повышения активности сопровождался увеличением доли активатора PA28 $\alpha\beta$ и иммунных протеасом с субъединицами LMP7 и/или LMP2 в общем протеасомном пуле. Наиболее значимый “скачок” в содержании иммунных субъединиц в тонком кишечнике выявлен на Э21 и П0 (день рождения, изменение условий питания). Таким образом, дополнительная выработка иммунных протеасом может быть одним из факторов, способствующих существенному повышению активности в перинатальный период. Дальнейшее развитие тонкого кишечника с П1 по П30 сопровождалось менее значительным увеличением содержания иммунных субъединиц. Все исследованные типы активности и количество субъединиц протеасом и активаторов в переломные периоды (Э21, П0, П30) не зависели от пола крыс. Активность иммунных субъединиц детектирована в нескольких формах протеасом, 20S-19S, 20S-PA28 $\alpha\beta$ и 20S, различающихся наличием или отсутствием того или иного активатора. Можно полагать, что множественные формы иммунных протеасом образуют биологически активные пептиды в несколько этапов. По-видимому, протеасомы 20S-19S, содержащие иммунные субъединицы, на первом этапе продуцируют из полноразмерных убиквитинированных белков полипептиды меньшего размера со специфической структурой, которые служат субстратами для 20S-PA28 $\alpha\beta$ и/или 20S протеасом. Последние на заключительном этапе, вероятно, образуют пептиды, непосредственно участвующие в межклеточных взаимодействиях и развитии иммунной функции, а также в адаптации к микробиоте и изменяющимся условиям питания.

Ключевые слова: активность протеасом, иммунные протеасомы, активаторы протеасом, тонкий кишечник, ранний онтогенез, крыса

DOI: 10.31857/S0475145022010049

ВВЕДЕНИЕ

Исследование молекулярных механизмов развития органов млекопитающих является актуальной задачей современной биологии. Решение этой задачи перспективно не только для фундаментальной науки, но и для выявления причин возникновения различных патологий (Sassin,

2018, 2020). В связи с этим все более важным становится изучение тонких механизмов функционирования протеасом, мультисубъединичных протеаз, участвующих в поддержании гомеостаза белков и регулирующих многочисленные клеточные процессы. Протеасомы образуют биологически активные пептиды, гидролизуют факторы роста, рецепторы, транскрипционные факторы, компонен-

ты сигнальных путей и другие белки (Abramova et al., 2002; Spirina et al., 2013; Kondakova et al., 2020). Многообразии функций протеасом обеспечивается множественностью их форм, основанной на структурных различиях и способах гидролиза белков.

Наименьшей функциональной структурой является 20S коровая субчастица протеасом, доступ в которую для белковых субстратов, как правило, заблокирован. Тем не менее, 20S субчастица сама по себе способна утилизировать белки, поврежденные окислительным стрессом, и ряд иных белков (Davies, Shringarpure, 2006; Voigt et al., 2007; Raynes et al., 2016). Проникновение большинства белков в протеолитическую камеру протеасом обеспечивают активаторы 19S (PA700), 11S (PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ), PA200, образующие крупные комплексы при соединении с 20S субчастицей (Tanaka, 2009; Stadtmueller, Hill, 2011; Kish-Trier, Hill, 2013). Активатор 19S способен распознавать, захватывать и пропускать в протеолитическую камеру белки, меченные убиквитиновой цепочкой, за счет своей многофункциональной мультисубъединичной структуры. В отличие от активатора 19S, регуляторы 11S и PA200, как правило, не пропускают в протеолитическую камеру полноразмерные убиквитинированные белки, но открывают вход для полипептидов среднего и малого размеров без предварительного их убиквитинирования.

По набору протеолитически активных субъединиц пул протеасом можно разделить на конститутивные протеасомы или протеасомы “домашнего хозяйства”, содержащие субъединицы β 1, β 2 и β 5, и несколько субтипов иммунных протеасом, встраивающих иммунные субъединицы LMP2 (β 1i), LMP10 (MECL1, β 2i) и LMP7 (β 5i) вместо конститутивных субъединиц либо полностью, либо в различных сочетаниях с ними (Groettrup et al., 1997; Griffin et al., 1998; Guillaume et al., 2010; Dahlmann, 2016). Конститутивные субъединицы β 1, β 2 и β 5 проявляют соответственно каспазоподобную (КП), трипсинподобную и химотрипсинподобную (ХТП) активность, при замене конститутивных субъединиц на иммунные увеличивается ХТП и трипсинподобная активность и уменьшается КП активность. Если основная функция конститутивных протеасом заключается в выполнении рутинного белкового обмена и устранении поврежденных белков, то иммунные протеасомы, образуя специфические пептиды, регулируют развитие и подавление иммунных реакций, клеточную пролиферацию, адаптивные процессы (Caudill et al., 2006; Sharova, 2006; Tanaka, 2009; Lyupina et al., 2013; Erokhov et al., 2017; Astakhova et al., 2019).

Иммунные протеасомы настолько важны для развития организма, что образование их начина-

ется уже в эмбриональный период в тимусе, селезенке, печени (Melnikova et al., 2008; Sharova et al., 2009; Melnikova et al., 2010; Karpova et al., 2013). Динамика экспрессии иммунных протеасом в развитии этих органов различна, что обусловлено разницей в их клеточном составе и функциях. В тимусе крысы экспрессия иммунных протеасом выходит на максимальный уровень уже на 21-й эмбриональный день в связи с обеспечением ими начинающегося в этот период процесса отрицательной селекции тимоцитов (Melnikova et al., 2008, 2010). В развивающихся селезенке и печени крысы уровень иммунных протеасом увеличивается в течение трех постнатальных недель. В селезенке этот процесс осуществляется последовательно в тесной связи с постепенным формированием белой пульпы. В печени нарастание экспрессии иммунных протеасом носит волнообразный характер: первая волна совпадает с функционированием печени как первичного лимфоидного органа, а вторая – с экспрессией иммунных протеасом в гепатоцитах (Sharova et al., 2009; Karpova et al., 2013). Очевидно, что низкое количество иммунных протеасом в гепатоцитах в первые две постнатальные недели неспособно обеспечить эффективное образование антигенных эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости класса I в случае инфицирования и инициировать полноценный иммунный ответ. Согласно полученным данным, такой ответ возможен на третьей постнатальной неделе, когда, во-первых, гепатоциты уже обладают базовым уровнем иммунных протеасом и, во-вторых, сформирована белая пульпа селезенки клетками иммунной системы, обогащенными иммунными протеасомами. Начиная с этого периода клетки печени способны сигнализировать иммунной системе о синтезе ими чужеродных белков, а клетки белой пульпы селезенки способны реагировать на эти сигналы.

Несмотря на достигнутые успехи в выявлении протеасомных механизмов развития ряда органов, не изучен пул протеасом, включающий различные структурные формы, в эмбриональном и раннем постнатальном онтогенезе кишечника, выполняющего важнейшие функции не только в пищеварении, но и в иммунных процессах. Цель настоящей работы – исследовать, каким образом различные периоды раннего развития тонкого кишечника крысы связаны с изменениями в пуле протеасом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работу выполняли на крысах породы Вистар в соответствии с положениями Комиссии по биоэтике ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Для исследования использовали целый кишечник плодов на 18-й день эмбрионального развития (Э18), тонкий кишеч-

ник самок на Э21 и постнатальные дни П0 (день рождения), П1, П5, П8, П12, П15, П18, П22, П30, а также тонкий кишечник самцов на Э21, П0, П30.

Антитела и основные реактивы. Для Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$ протеасом, иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице Rpt6 активатора PA700 протеасом, поликлональные антитела кролика к субъединице PA28 α активатора PA28 $\alpha\beta$ протеасом (Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания).

Для определения ХТП активности протеасом использовали субстрат N-succinyl-leu-leu-val-tyr-7-amido-4-methyl coumarin (Suc-LLVY-AMC), КП активности – субстрат Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methyl coumarin (Z-LLE-AMC) (Sigma-Aldrich, США), LMP2 и LMP7 активности – субстраты Ac-Pro-Ala-Leu-AMC (Ac-PAL-AMC) и Ac-Ala-Asn-Trp-AMC (Ac-ANW-AMC) (Boston Biochem, США) соответственно. Наличие примесных протеаз выявляли с помощью ингибитора протеасом Z-leucyl-leucyl-leucinal (MG132) (Sigma-Aldrich, США).

Препарирование кишечника и приготовление осветленных гомогенатов. Выделенный орган (целый кишечник или тонкий кишечник) погружали в фосфатный солевой буфер (PBS, pH 7.4), содержащий 1 мМ фенолметилсульфонил фторид (PMSF) для ингибирования активности протеаз внутрикишечной полости. Все дальнейшие процедуры, связанные с очисткой кишечника от соединительнотканых пленок и внутриполостного содержимого, проводили в PBS с 1 мМ PMSF. Образцы очищенного кишечника обсушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали и замораживали при температуре -70°C .

Для определения активности протеасом *in vitro* и Вестерн-блоттинга запасенные образцы размораживали, гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ АТФ, 1 мМ PMSF, лейпептин (0.5 мкг/мл), пепстатин (1 мкг/мл), апротинин (1 мкг/мл), в соотношении 1 : 6 (вес : объем) при 0°C и осветляли центрифугированием при 15400 g и 4°C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость (осветленные гомогенаты) использовали для дальнейших исследований.

Для нативного электрофореза образцы гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ Na-HEPES, pH 7.5, 200 мМ NaCl и 10 мМ ЭДТА, в соотношении 1 : 3 (вес : объем).

Определение активности протеасом *in vitro*. Реакцию проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 1 мМ ди-

тиотреитол, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ АТФ, 30 мкМ соответствующего флуорогенного субстрата и 2 мкл осветленного гомогената, при 37°C в течение 20 мин и останавливали 1%-ным SDS. В данных условиях зависимость количества образующегося продукта от времени соответствовала прямолинейному участку графика (Erokhov et al., 2017). Интенсивность флуоресценции регистрировали на флуориметре (Bio-Rad, США) при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны испускания 440 нм. Для оценки активности примесных протеаз использовали ингибитор активности протеасом MG132 в концентрации 5–10 мкМ.

Определение активности протеасом в неденатурирующем геле. Активность протеасом в градиентном 4–10% полиакриламидном геле (5 мкл осветленного гомогената или 70–90 мкг белка на дорожку) в нативных условиях определяли с использованием 300 мкМ флуорогенного субстрата в 200 мМ Na-HEPES буфере, pH 7.5 (1/20 от объема геля) после электрофореза при 60 В в течение 14 ч, 140 В в течение 10 ч и 260 В в течение 20 ч (Erokhov et al., 2017). Следует отметить, что описанные в литературе протоколы нативного электрофореза применяются, как правило, для очищенных фракций протеасом или для разделения протеасом клеточных линий (Lyurina et al., 2013). При использовании грубых фракций, полученных из целых органов, содержащиеся в них нуклеиновые кислоты, микросомы, мелкие фрагменты соединительной ткани препятствуют проникновению белков с высокой молекулярной массой в гель и представляют собой основную проблему электрофореза. В условиях стандартного начального напряжения 140 В протеасомы, неспецифически связанные с нуклеиновыми кислотами или микросомами, “размываются” по гелю, начиная со стартовой позиции. Мы решили эту проблему главным образом путем снижения начального напряжения до 60 В и поэтапным его увеличением до 260 В (Erokhov et al., 2017).

Флуоресцентные полосы в геле фотографировали при 365 нм. Анализ активности протеасом в геле осуществляли с помощью стандартной программы ImageJ.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза в неденатурирующих условиях в 13% полиакриламидном геле (10 мкл осветленного гомогената или 60–78 мкг белка на дорожку), полипептиды переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью полусухого блоттинга. Обработку мембраны осуществляли стандартным методом с использованием первых антител к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$, LMP7, LMP2, β -actin (1 : 1000), Rpt6 или PA28 α (1 : 1500) и соответствующих вторых антител, конъюгированных с пероксидазой (1 : 2000). Изображение анализировали с помощью стан-

дартной программы ImageJ, как описано ранее (Astakhova et al., 2018).

Результаты нормализовали на содержание β -актина. Несмотря на добавление коктейля ингибиторов протеаз в гомогенизирующий буфер, β -актин не детектировался во фракциях тонкого кишечника на ПЗ–П8, но в них выявлялся полипептид меньшей молекулярной массы, который взаимодействовал с антителами к β -актину. Этот результат указывал на отщепление части молекулы β -актина в приготовленных образцах. Добавление ингибитора протеасом MG132 в концентрации 5 мкМ к гомогенизирующему буферу подавляло расщепление β -актина. Очевидно, при приготовлении образцов тонкого кишечника на ПЗ–П8 имела место модификация молекулы β -актина, которая делала ее доступной для протеасом. Поэтому протокол определения количества β -актина предусматривал введение в гомогенизирующий буфер ингибитора протеасом MG132 в концентрации 5 мкМ.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился в пакете программ GraphPad Prism 8.0 с использованием статистических методов: Brown-Forsythe ANOVA, Welch ANOVA, Kruskal-Wallis тест и two-way ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность протеасом в раннем онтогенезе тонкого кишечника крыс. Исследована ХТП и КП активность протеасом, проявляемая в совокупности конститутивными и иммунными субъединицами $\beta 5 + \text{LMP7}$ и $\beta 1 + \text{LMP2}$ соответственно, а также индивидуальная активность иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 в раннем онтогенезе тонкого кишечника. Проведено детальное исследование этих типов активности у самок крыс в эмбриональный период (на Э21) и в первый месяц постнатального развития. На Э18 половую принадлежность у плодов идентифицировать невозможно, так же как и вычленив тонкий кишечник. Поэтому на Э18 анализировали активность протеасом целого кишечника плодов крыс безотносительно пола.

Выявлено, что все исследуемые типы активности протеасом изменяются в раннем развитии, при этом обнаруживаются как сходные характеристики, так и различия (рис. 1). Сходство проявляется в следующем. Во-первых, вся исследуемая активность повышалась после Э18 и достигала максимума на П5–П15. Такая динамика логична, так как переход организма от *in utero* к *ex-utero* сопровождается значительными перестройками в кишечнике: изменением кровотока и роста, развитием пищеварительной и иммунной функций, колонизацией микроорганизмами и адаптационными процессами (Nanthakumar et al., 2000; Claud et al., 2003). Во-вторых, сходство заключается в умень-

шении всей исследуемой активности к П22. Очевидно, в этот период нет потребности кишечника в высокоактивных протеасомах. Разница касается следующего. Во-первых, ХТП и LMP7 активность падала к П22 в существенно меньшей степени по сравнению с КП и LMP2 активностью. Во-вторых, к П30 только ХТП и LMP7 активность вновь возрастала до максимальных уровней. Отметим, что к П30 животные были изолированы от матери и адаптировались к внешнему питанию. Очевидно, эта адаптация требует высокой ХТП и LMP7 активности.

Особый вопрос в исследовании кишечника касается вклада в детектируемую активность протеасом активности бактериальных протеасом. Несмотря на проводимую нами обязательную процедуру отмывания внутренней полости кишечника, следует учитывать наличие в ней несмываемой части бактериальной флоры. В отличие от клеток эукариот прокариоты проявляют всего лишь один тип активности протеасом, бортезомиб-чувствительную активность (Risa et al., 2020). Поскольку бортезомиб – ингибитор ХТП активности протеасом эукариот, нельзя полностью исключить, что бактерии могут вносить вклад в эту активность, хотя используемый в данной работе субстрат для них не оптимален. Тем не менее, если этот вклад и имеет место, он незначителен и не может существенно исказить выявленную динамику, подтверждением чему служит сходство графиков для ХТП и LMP7 активности (рис. 1), последняя из которых присуща только млекопитающим.

Таким образом, выявлены переломные временные точки в динамике активности протеасом тонкого кишечника самок крыс. Для всех исследованных типов активности это перинатальный период, Э21 и/или П0. Кроме того, для ХТП и LMP7 активности детектирована дополнительная переломная точка, П30 (рис. 1). К П30 у самок крыс изменяется гормональный фон, и к П32–П33 наступает стадия первого проэструса (Vidal, 2017). Для оценки влияния фактора пола на образование переломных точек проведено сравнительное исследование активности протеасом тонкого кишечника самок и самцов крыс на Э21, П0 и П30. Оказалось, что фактор пола не оказывает влияния на активность протеасом в указанные переломные периоды (рис. 2).

Что в таком случае обеспечивает выявленную нами сложную динамику протеасомной активности в развивающемся кишечнике крысы? Ранее было показано, что активность протеасом может определяться различными факторами, к числу которых относятся общее количество протеасом, сочетание протеолитических субъединиц, наличие того или иного регулятора, окислительный стресс и др. (Tanaka, 2009; Astakhova et al., 2018; Erokhov et al., 2021). В настоящей работе мы ис-

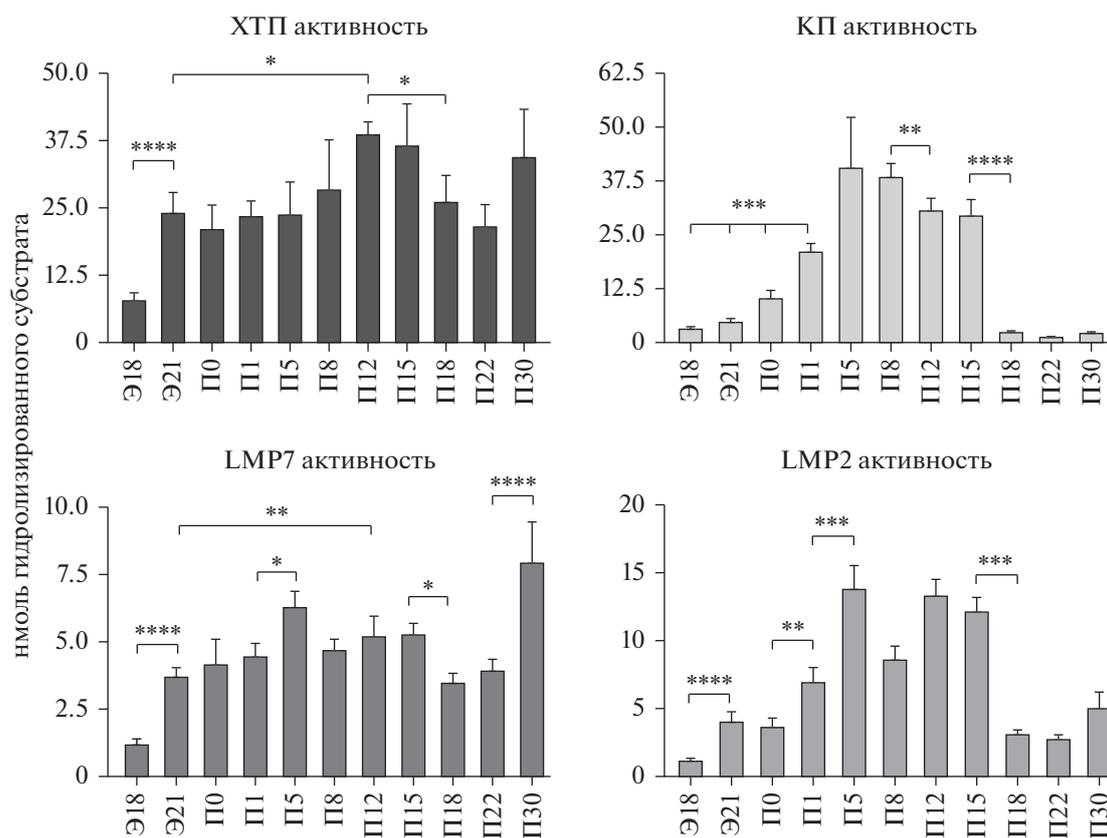


Рис. 1. Динамика активности протеасом в раннем онтогенезе тонкого кишечника самок крыс. Активность приведена для 100 мкл осветленных гомогенатов и представлена как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ХТП активность – химотрипсинподобная активность, КП активность – каспазаподобная активность, Э – эмбриональный день, П – постнатальный день. На Э18 использовали целый кишечник плодов крыс безотносительно пола.

следовали уровень тотального пула протеасом и динамику содержания в нем иммунных субъединиц и активаторов в сравнении с динамикой активности протеасом.

Содержание субъединиц протеасом и активаторов в раннем онтогенезе тонкого кишечника крыс. Уровень тотального пула протеасом оценивали по содержанию субъединиц $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$, входящих в состав всех субтипов протеасом. Изменение количества активатора 19S изучали по содержанию входящей в его состав субъединицы Rpt6, а активатора PA28 $\alpha\beta$ – по содержанию субъединицы PA28 α . Изменение количества иммунных протеасом исследовали по содержанию иммунных субъединиц LMP7 и LMP2. Иммунная субъединица LMP10 встраивается в протеасомы, как правило, совместно с субъединицей LMP2 (Groettrup et al., 1997; Griffin et al., 1998), поэтому отдельно уровень LMP10 субъединицы не изучали.

Уровень тотального пула протеасом тонкого кишечника самок крыс достоверно не изменялся в перинатальный период и на протяжении первого месяца постнатального развития (рис. 3, 4) и не

мог повлиять на активность протеасом. Вместе с тем, на фоне постоянного количества протеасом произошли перестройки в их структуре за счет увеличения содержания протеолитических иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 (рис. 3, 4) и, следовательно, LMP10, замещающих протеолитические конститутивные субъединицы. Причем наиболее значимый “скачок” в содержании иммунных субъединиц, подобно протеасомной активности, выявлен на Э21 и П0. Таким образом, дополнительная наработка иммунных протеасом может быть одним из факторов, способствующих существенному повышению активности в перинатальный период. Дальнейшее развитие кишечника с П1 по П30 сопровождалось более плавным повышением количества иммунных субъединиц с достоверным “провалом” на П22 в графике для LMP7 (рис. 4). Эта динамика похожа на динамику ХТП и LMP7 активности и может служить ее обоснованием.

Отметим, что замена конститутивных протеолитических субъединиц иммунными субъединицами приводит к увеличению ХТП активности и уменьшению КП активности (Tanaka, 2009). Воз-

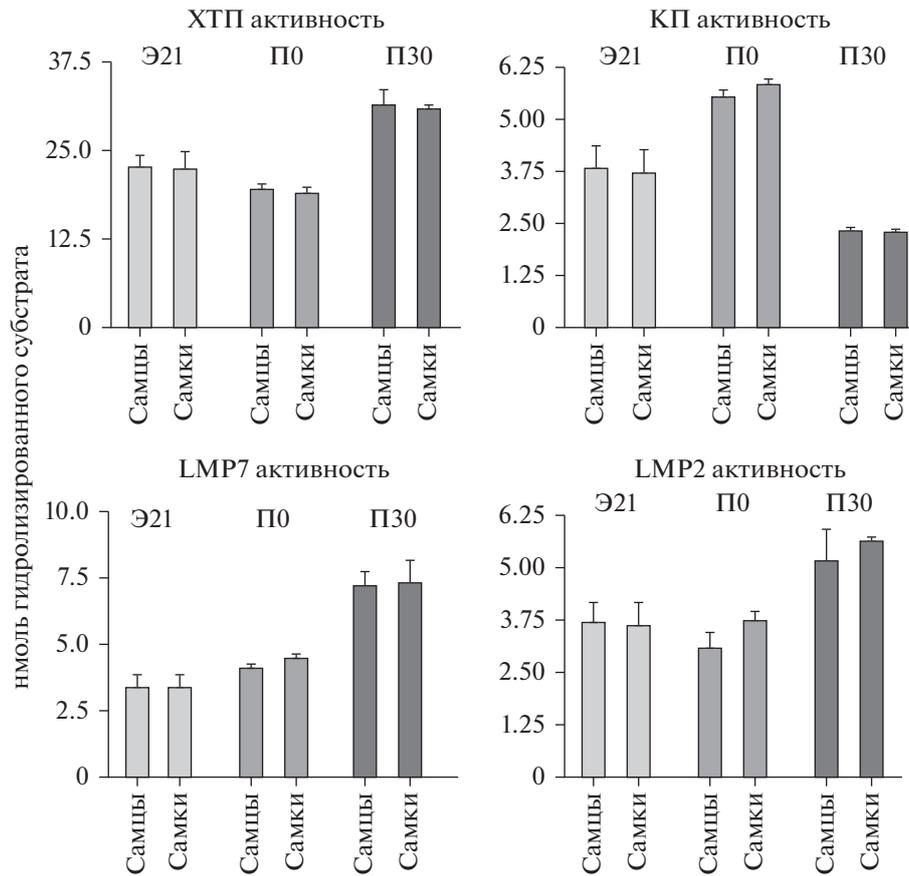


Рис. 2. Активность протеасом тонкого кишечника самцов и самок крыс в разные периоды раннего онтогенеза. Активность приведена для 100 мкл осветленных гомогенатов и представлена как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 5$. ХТП активность – химотрипсинподобная активность, КП активность – каспазаподобная активность, Э – эмбриональный день, П – постнатальный день.

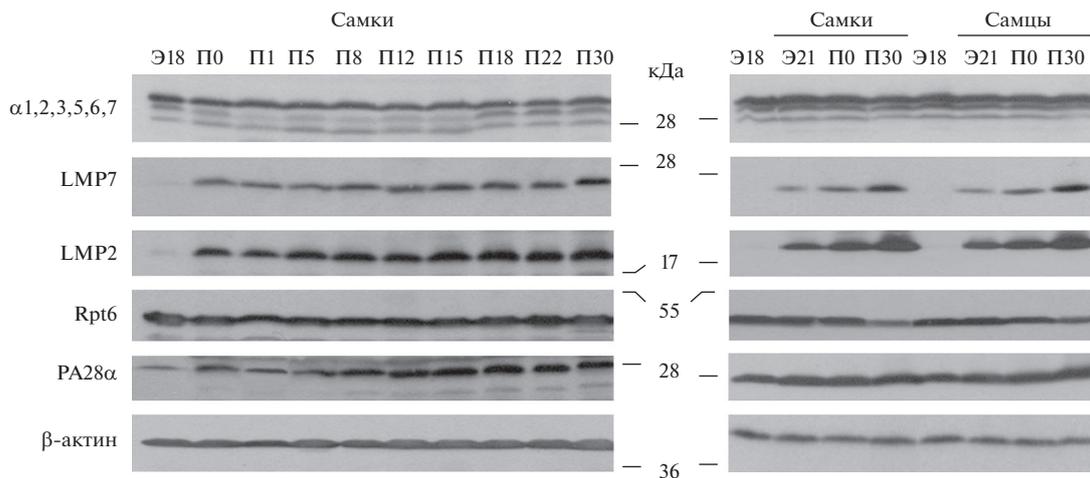


Рис. 3. Вестерн-блоты субъединиц протеасом и активаторов в разные периоды раннего развития тонкого кишечника самок и самцов крыс с использованием соответствующих антител. Указана локализация в геле маркеров молекулярной массы. В качестве внутреннего контроля использован β -актин. Э – эмбриональный день, П – постнатальный день. На Э18 использовали целый кишечник плодов крыс безотносительно пола.

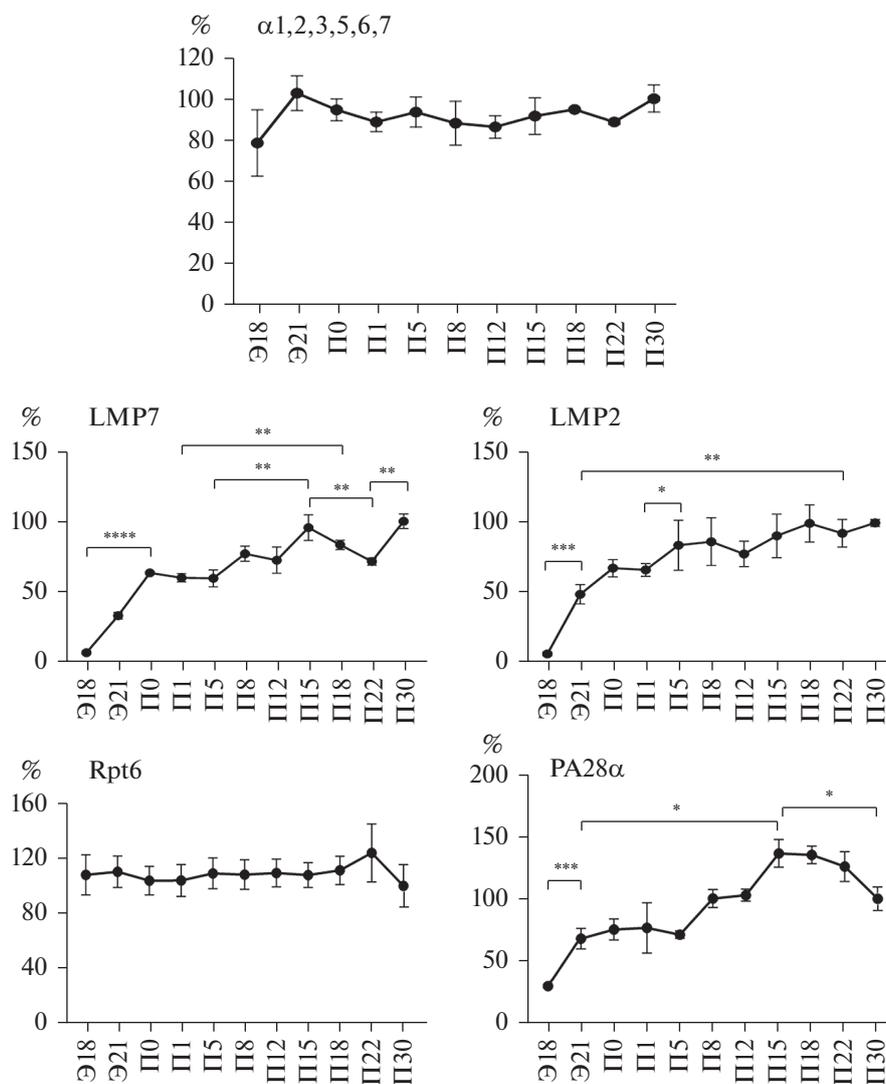


Рис. 4. Динамика содержания субъединиц протеасом и активаторов в тонком кишечнике самок крыс в раннем развитии. За 100% принимали значения на П30. Данные нормализованы на содержание β -актина и представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Э – эмбриональный день, П – постнатальный день. На Э18 использовали целый кишечник плодов крыс безотносительно пола.

можно, количество субъединицы LMP2 на П18–П30 стало достаточно высоким для того, чтобы объяснить падение КП активности в этот период. Нельзя исключить в данном случае и наличие иных регуляторов. Вместе с тем, остается непонятным падение LMP2 активности на П18–П30 по сравнению с П15, динамика которой именно в эти дни не соответствует динамике количества самой субъединицы. Очевидно, в кишечнике существуют дополнительные факторы, подавляющие LMP2 активность. Мы полагаем, что к ним можно причислить выявленное в данной работе уменьшение содержания активатора PA28 $\alpha\beta$ после П18 (рис. 3, 4).

Динамика содержания активатора PA28 $\alpha\beta$ (но не активатора 19S) в раннем развитии тонкого ки-

шечника крысы оказалась разнонаправленной. С Э18 до П15 количество этого активатора четырехкратно увеличилось, что может быть связано с его участием в развитии адаптивных процессов и образовании регуляторных пептидов. Содержание активатора 19S, напротив, не менялась (рис. 3, 4). Очевидно, исходный уровень 19S активатора, свойственный эмбриональному периоду, достаточен для осуществления основных его функций – обеспечения устранения поврежденных убиквитинированных белков и убиквитинзависимого рутинного белкового обмена в тонком кишечнике в течение первого месяца постнатального развития.

Количество всех исследуемых субъединиц протеасом и активаторов в переломные временные точки, Э21, П0 и П30, выявленные для актив-

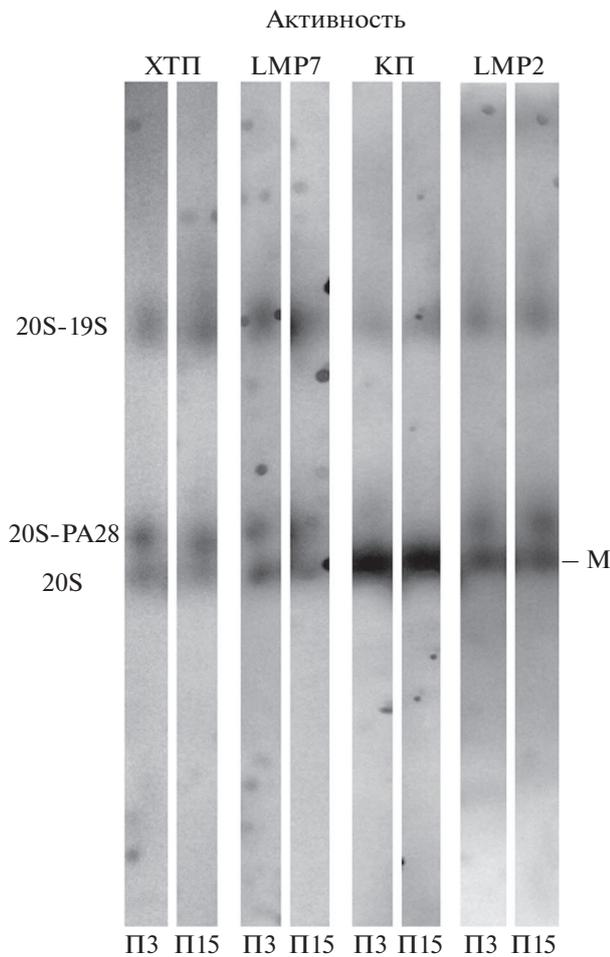


Рис. 5. Распределение активности протеасом тонкого кишечника самок крыс в неденатурирующем геле на П3 и П15. Тироглобулин (670 кДа), меченный красителем Су-3.5, использован как маркер (М) молекулярной массы. ХТП активность – химотрипсинподобная активность, КП активность – каспазаподобная активность, П – постнатальный день.

ности, было одинаково у самок и самцов (рис. 3), что указывает на независимость протеасомной системы в целом от половых различий, по крайней мере, в указанные периоды.

Следует отметить, что ранее были обнаружены иммунные субъединицы протеасом в кишечнике крысы, начиная с 3-й недели постнатального развития (Claud et al., 2014). Нам же удалось детектировать их, начиная с эмбрионального периода. Такая разница в результатах связана, на наш взгляд, с анализом разных фракций протеасом. Авторы приведенной работы исследовали очищенную фракцию 26S протеасом. Мы изучали грубую фракцию протеасом – осветленный гомогенат, обогащенный цитоплазматическими формами протеасом, в том числе формами, включающими иммунные субъединицы. На следующем этапе работы мы разделили формы протеасом

развивающегося кишечника и проанализировали активность, с ними связанную.

Распределение активности протеасом тонкого кишечника крыс в неденатурирующем геле. Протеасомы разделяли с помощью метода нативного электрофореза, разработанного нами для грубых фракций (Erokhov et al., 2017). Для исследования выбрали два периода: П3 – один из первых дней развития животных вне материнского организма и П15 – период высокой активности протеасом и содержания иммунных субъединиц и активатора PA28 $\alpha\beta$. Формы протеасом идентифицировали по их локализации в геле в соответствии с опубликованными ранее результатами (Erokhov et al., 2017).

Как на П3, так и на П15 в кишечнике выявлены три формы протеасом, 20S-19S, 20S-PA28 $\alpha\beta$ и 20S, которые проявляли все четыре исследуемые типа активности, но в разной степени (рис. 5). ХТП активность в большей мере была связана со структурами 20S-19S и 20S-PA28 $\alpha\beta$, активность субъединицы LMP7 была распределена между всеми структурами протеасом равномерно (рис. 5, табл. 1). Вместе с тем, КП и LMP2 активность детектировалась, в основном, во фракции 20S (рис. 5, табл. 1). Можно полагать, что такое распределение активности важно для образования биологически активных пептидов в несколько этапов. По-видимому, протеасомы 20S-19S, содержащие иммунные субъединицы, на первом этапе образуют из полноразмерных убиквитинированных белков полипептиды меньшего размера со специфической структурой, которые служат субстратами для 20S-PA28 $\alpha\beta$ и/или 20S протеасом. Последние на заключительном этапе, вероятно, образуют пептиды, непосредственно участвующие в межклеточных взаимодействиях и развитии адаптационных процессов и иммунной функции. Особая роль при этом, очевидно, принадлежит наиболее выработанной КП и LMP2 активности 20S протеасом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в настоящей работе впервые показано, что в конце эмбрионального развития и на протяжении первого месяца постнатального развития в пуле протеасом тонкого кишечника крысы происходит смещение баланса в сторону увеличения доли иммунных протеасом. Если сравнить динамику уровня иммунных протеасом в развивающемся кишечнике с опубликованными ранее данными по развивающимся тимусу и селезенке (Melnikova et al., 2008; Кагорова et al., 2013), то можно заключить, что кишечник занимает промежуточное положение между этими органами. В тимусе, первичном лимфоидном органе, содержание иммунных протеасом достигает максимума уже на Э21, что свидетельствует о начале процесса отрицательной селекции тимоцитов с участием иммунных про-

Таблица 1. Активность протеасом тонкого кишечника самок крыс во фракциях, разделенных в неденатурирующем геле

Активность	Активность протеасом, % (^a)			
	Фракция 20S-PA28		Фракция 20S	
	П3	П15	П3	П15
ХТП	127 ± 14	122 ± 8	65 ± 7*	55 ± 9*
LMP7	96 ± 11	90 ± 12	97 ± 15	77 ± 21
КП	69 ± 10	51 ± 8	522 ± 49***	498 ± 65***
LMP2	125 ± 10	136 ± 19	288 ± 22**	212 ± 27**

(^a) За 100% принята активность во фракции 20S-19S. Активность представлена как среднее ± стандартное отклонение, $n = 5$. Достоверное отличие от соответствующих значений во фракциях 20S-19S и 20S-PA28 при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$. ХТП активность – химотрипсинподобная активность, КП активность – каспазаподобная активность, П – постнатальный день.

теасом в эмбриональном развитии. В селезенке, вторичном лимфоидном органе, основной прирост количества иммунных протеасом приходится на третью постнатальную неделю и совпадает с завершением формирования белой пульпы Т-лимфоцитами, обогащенными иммунными протеасомами. Кишечник является не только органом пищеварения, но и выполняет иммунную функцию за счет лимфоидной ткани слизистой оболочки. Функцию пищеварения кишечник приобретает сразу после рождения, что сопровождается его адаптацией к пищевым антигенам и заселяющей его микробиоте. К тому же, в этот период начинается формирование иммунной функции. Неудивительно, что резкий подъем количества иммунных протеасом, участвующих в адаптивных процессах и иммунных реакциях, обнаружен при переходе от *in utero* к *ex-utero*, на Э21 и П0 (рис. 3, 4). За этим подъемом следует менее значительное увеличение содержания иммунных протеасом в первый постнатальный месяц, что отличает кишечник и от тимуса, и от селезенки.

В настоящей работе обнаружены различные формы протеасом, 20S-19S, 20S-PA28 $\alpha\beta$ и 20S, проявляющие активность иммунных субъединиц, в развивающемся тонком кишечнике крысы (рис. 5). Не исключено, что каждая из этих форм объединяет субтипы иммунных протеасом с разным сочетанием протеолитически активных иммунных и конститутивных субъединиц. Иммунные протеасомы, по-видимому, экспрессируются в различных клетках тонкого кишечника, включая клетки эпителия и клетки лимфоидных скоплений, что обусловлено разнообразием функций множественных субтипов иммунных протеасом. Так, протеасомы, содержащие все иммунные субъединицы, образуют антигенные эпитопы для молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Субъединицы LMP7 и LMP10 важны для

контроля клеточной пролиферации (Caudill et al., 2006). Протеасомы с субъединицами LMP2 и/или LMP7 играют роль в межклеточных взаимодействиях и адаптационных процессах (Lyupina et al., 2013; Erokhov et al., 2017).

Следует подчеркнуть, что баланс в клеточном пуле протеасом смещается в сторону увеличения количества иммунных протеасом и в опухолевом процессе, в том числе в развитии опухолей кишечника (Astakhova et al., 2017, 2020; Erokhov et al., 2021). Однако при опухолевом росте экспрессия LMP2-содержащих субтипов возрастает гораздо более значительно, чем экспрессия LMP7-содержащих субтипов. В развивающемся кишечнике динамика экспрессии LMP2 и LMP7 субъединиц, выявленная в настоящей работе, в основном, сходна (рис. 4), что является признаком нормального процесса.

Таким образом, можно заключить, что различные структуры протеасом с иммунными субъединицами, формирующиеся в раннем онтогенезе тонкого кишечника, играют важную роль в адаптации к микробиоте и изменяющимся условиям и рациону питания, а также в обеспечении нормальной клеточной пролиферации и становлении иммунной функции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН за предоставление оборудования для исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0088-2021-0008 в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Шарова Н.П. и Астахова Т.М. разработали эксперимент. Астахова Т.М. и Карпов Н.С. подготовили образцы кишечника крыс. Астахова Т.М., Карпов Н.С. и Ерохов П.А. провели экспериментальное исследование протеасом в образцах. Карпов Н.С. провел статистическую обработку результатов. Карпов Н.С. и Шарова Н.П. подготовили иллюстративный материал. Шарова Н.П. подготовила драфт статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и корректировке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramova E.B., Sharova N.P., Karpov V.L.* The proteasome: Destroy to live // *Mol. Biol.* 2002. V. 36. № 5. P. 613–624.
- Astakhova T.M., Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Karpova Y.D., Lyupina Yu.V., Ushakova E.M., Legach E.I., Bondarenko T.P., Sharova N.P.* Proteasome expression in ovarian heterotopic allografts of Wistar and August rats under induction of donor specific tolerance // *Russ. J. Dev. Biol.* 2019. V. 50. № 5. P. 261–267.
- Astakhova T.M., Ivanova E.V., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Afanas'ev S.G., Goncharov A.L., Kondakova I.V., Sharova N.P.* Effect of neoadjuvant chemoradiation therapy on proteasome pool in rectal cancer // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 164. № 8. P. 191–194.
- Astakhova T.M., Moiseeva E.V., Sharova N.P.* Features of the proteasome pool in spontaneously occurring malignant tumors of the mammary gland in mice // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. № 5. P. 317–322.
- Astakhova T.M., Morozov A.V., Erokhov P.A., Mikhailovskaya M.I., Akopov S.B., Chupikova N.I., Safarov R.R., Sharova N.P.* Combined effect of bortezomib and menadione sodium bisulfite on proteasomes of tumor cells: The dramatic decrease of bortezomib toxicity in a pre-clinical trial // *Cancers.* 2018. V. 10. № 10. pii: E351.
- Caudill C.M., Jayarapu K., Elenich L., Monaco J.J., Colbert R.A., Griffin T.A.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 7. P. 4075–4082.
- Claud E.C., McDonald J.A.K., He S.-M., Yu Y., Duong L., Sun J., Petrof E.O.* Differential expression of 26S proteasome subunits and functional activity during neonatal development // *Biomolecules.* 2014. V. 4. P. 812–826.
- Claud E.C., Savidge T., Walker W.A.* Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors // *Pediatr. Res.* 2003. V. 53. P. 419–425.
- Dahlmann B.* Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 591. P. 132–140.
- Davies K.J., Shringarpure R.* Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and in inflammatory neuromuscular diseases // *Neurology.* 2006. V. 66. P. S93–S96.
- Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova Y.D., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Goncharov A.L., Razbirin D.V., Gorelova V.S., Sharova N.P., Astakhova T.M.* Proteasomes in patient rectal cancer and different intestine locations: Where does proteasome pool change? // *Cancers.* 2021. V. 13. № 5. P. 1108.
- Erokhov P.A., Lyupina Yu.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Yu.O., Sharova N.P.* Detection of active proteasome structures in brain extracts: Proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 41. P. 70941–70957.
- Groettrup M., Stander S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M.* The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 8970–8975.
- Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J., van Kaer L., Monaco J.J., Colbert A.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. P. 97–104.
- Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D., van Holle B., Parvizi G., Bousquet-Dubouch M.P., Théate I., Parnetier N., van den Eynde B.J.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 18599–18604.
- Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Astakhova T.M., Stepanova A.A., Erokhov P.A., Abramova E.B., Sharova N.P.* Immune proteasomes in the development of rat immune system // *Bioorg. Khim.* 2013. V. 39. P. 400–410.
- Kish-Trier E., Hill C.P.* Structural biology of the proteasome // *Annu. Rev. Biophys.* 2013. V. 42. P. 29–49.
- Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A., Astakhova T.M., Zakharova L.A., Sharova N.P.* Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: mutual regulation // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 4. pii: E500.
- Lyupina Yu.V., Abaturova S.B., Erokhov P.A., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Mikhailov V.S.* Proteotoxic stress induced by Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells // *Virology.* 2013. V. 436. № 1. P. 49–58.
- Lyupina Yu.V., Bogatyrev M.E., Orlova A.S., Marjukhnic E.V., Kazansky D.B., Sharova N.P.* Proteasomes in the brain of β 2-microglobulin knockout mice // *Biochemistry (Moscow).* 2013. V. 78. № 10. P. 1124–1133.
- Melnikova V.I., Afanasieva M.A., Dmitrieva S.B., Karpova Ya.D., Sharova N.P., Zakharova L.A.* Immune

- proteasomes in the developing rat thymus // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. № 4. P. 451–457.
- Melnikova V.I., Sharova N.P., Maslova E.V., Voronova S.N., Zakharova L.A. Ontogenesis of rat immune system: Proteasome expression in different cell populations of the developing thymus // *Cell. Immunol.* 2010. V. 266. P. 83–89.
- Nanthakumar N.N., Fusunyan R.D., Sanderson I., Walker W.A. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 6043–6048.
- Raynes R., Pomatto L.C., Davies K.J. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways // *Mol. Aspects Med.* 2016. V. 50. P. 41–55.
- Risa G.T., Hurtig F., Bray S., Hafner A.E., Harker-Kirschneck L., Faull P., Davis C., Papatziomou D., Mutavchiev D.R., Fan C. et al. The proteasome controls ESCRT-III-mediated cell division in an archaeon // *Science*. 2020. V. 369. № 6504: eaaz2532.
- Sassin W. Zu den Grenzen menschlicher Erkenntnis // *Beacon J. Stud. Ideol. Ment. Dimens.* 2018. V. 1. Art. 010310202. <https://hdl.handle.net/20.500.12656/thebeacon.1.010310202>
- Sassin W. Der Konflikt zwischen Ideologien und einer nüchternen und umfassenden Sichtweise: Nachhaltig gegen Resilient? // *Beacon J. Stud. Ideol. Ment. Dimens.* 2020. V. 3. Art. 020440211. <https://hdl.handle.net/20.500.12656/thebeacon.3.020440211>
- Sharova N.P. Immune proteasomes and immunity // *Russ. J. Dev. Biol.* 2006. V. 37. P. 139–145.
- Sharova N.P., Zakharova L.A., Astakhova T.M., Karpova Ya.D., Melnikova V.I., Dmitrieva S.B., Lyupina Yu.V., Erokhov P.A. New approach to study of T cellular immunity development: Parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis // *Cell. Immunol.* 2009. V. 256. P. 47–55.
- Spirina L.V., Kondakova I.V., Choyznzonov E.L., Chigevskaya S.Y., Shishkin D.A., Kulbakin D.Y. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1, NF- κ B in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpain activities // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013 V. 139. P. 625–633.
- Stadtmueller B.M., Hill C.P. Proteasome activators // *Mol. Cell.* 2011. V. 41. P. 8–19.
- Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and function // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 2009. V. 85. № 1. P. 12–36.
- Vidal J.D. The impact of age on the female reproductive system: A pathologist's perspective // *Toxicologic Pathology*. 2017. V. 45. № 1. P. 206–215.
- Voigt A., Salzmann U., Seifert U., Dathe M., Soza A., Kloetzel P.-M. 20S proteasome-dependent generation of an IEpp89 murine cytomegalovirus-derived H-2L(d) epitope from a recombinant protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 355. P. 549–554.

How Is the Development of the Rat Small Intestine Related to Changes in the Proteasome Pool?

N. S. Karpov¹, P. A. Erokhov¹, N. P. Sharova^{1, *}, and T. M. Astakhova¹

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

*e-mail: npsharova@bk.ru

The purpose of this work is to investigate how different periods of early development of the rat small intestine are associated with changes in the proteasome pool. It is shown that by the 21st embryonic day (E21) and up to the 30th day of postnatal development (P30), against the background of a constant number of proteasomes, their chymotrypsin-like and caspase-like activity, as well as the activity of the immune subunits LMP7 and LMP2, change. Both similar characteristics and differences in the dynamics of these activities were revealed. The similarity is shown in the following. First, all activities increase after E18 and reach their maximum values at P5–P15. These changes correspond to the period of accelerated intestinal growth, colonization with microbiota, development of adaptive processes and digestive and immune functions. Second, the similarity lies in the reduction of all activities to P22. The difference in the dynamics of activities concerns the following. First, chymotrypsin-like and LMP7 activities fall to P22 significantly to a lesser extent compared to caspase-like and LMP2 activities. Second, by P30 (the period of isolation from the mother), only chymotrypsin-like and LMP7 activities again increase to maximum levels, which indicates their possible role in adaptation to external nutrition. The period of increased activities was accompanied by an increase in the portion of the activator PA28 $\alpha\beta$ and immune proteasomes with LMP7 and/or LMP2 subunits in the total proteasome pool. The most significant “jump” in the content of immune subunits in the small intestine was detected at E21 and P0 (birthday, change in nutritional conditions). Thus, the additional formation of immune proteasomes may be one of the factors contributing to a significant increase in activities in the perinatal period. Further development of the small intestine from P1 to P30 was accompanied by a less significant increase in the expression of immune subunits. All the studied activities and the number of proteasome subunits and activators

in small intestine did not depend on the sex of the rats. The activities of immune subunits were detected in several forms of proteasomes, 20S-19S, 20S-PA28 $\alpha\beta$ and 20S, differing in the presence or absence of one or another activator. It can be assumed that multiple forms of immune proteasomes form biologically active peptides in several stages. Apparently, 20S-19S proteasomes containing immune subunits at the first stage produce smaller polypeptides with a specific structure from full-size ubiquitinated proteins, and these polypeptides serve as substrates for 20S-PA28 $\alpha\beta$ and/or 20S proteasomes. The latter at the final stage probably form peptides that are directly involved in intercellular interactions and development of immune function, as well as in adaptation to the microbiota and changing nutritional conditions.

Keywords: proteasome activities, immune proteasomes, proteasome activators, small intestine, early ontogenesis, rat

ВЛИЯНИЕ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИТРИФИКАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

© 2022 г. Е. Ю. Брусенцев^а, Т. Н. Игонина^а, С. В. Окотруб^а,
Э. А. Чуйко^а, С. Я. Амстиславский^а, *

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

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.06.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принята к публикации 07.09.2021 г.

В исследовании рассматривается влияние культивирования *in vitro* эмбрионов мыши с 200 мкМ линолевой кислоты (ЛК) в течение 48 ч на их жизнеспособность после витрификации. Флуоресцентная микроскопия эмбрионов, окрашенных DAPI, показала усиление фрагментации ядер в группе после воздействия ЛК без криоконсервации, и значительное уменьшение числа клеток у витрифицированных эмбрионов через 24 ч после их отогрева. Таким образом, культивирование *in vitro* с ЛК снижает жизнеспособность эмбрионов мыши после витрификации.

Ключевые слова: мыши, преимплантационные эмбрионы, внутриклеточные липиды, культивирование *in vitro*, линолевая кислота, витрификация

DOI: 10.31857/S0475145022010025

ВВЕДЕНИЕ

Липидные гранулы (ЛГ) являются внутриклеточными хранилищами жирных кислот (ЖК), триацилглицеринов, и других соединений, необходимых для метаболизма, синтеза мембран (Walther, Farese, 2012; Welte, Gould, 2017), а также нормального развития преимплантационных зародышей мышей (Tatsumi et al., 2018). Эти клеточные включения чувствительны к охлаждению и могут влиять на эффективность криоконсервации эмбрионов у некоторых видов млекопитающих (Pereira, Marques, 2008; Amstislavsky et al., 2019). Мышь, наряду с другими млекопитающими, используется в качестве модели для понимания роли внутриклеточных липидов в созревании ооцитов и развитии преимплантационных зародышей (Dunning et al., 2014; Arena et al., 2021).

Ранее было показано, что условия культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов могут влиять на количественный и качественный состав их внутриклеточных липидов (Lara et al., 2011). В частности, различные ЖК, добавленные в питательную среду, могут приводить к изменению состава ЛГ эмбрионов млекопитающих, что влияет на их развитие *in vitro* (Nonogaki et al., 1994; Nochi et al., 1999). Такой эффект оказывает, например, линолевая кислота (ЛК), которая может

привести к изменению внутриклеточного профиля ЖК ооцитов крупного рогатого скота (КРС) при их созревании *in vitro* (Lara et al., 2011). Также, культивирование *in vitro* эмбрионов КРС в среде, дополненной конъюгированным изомером ЛК, транс-10, цис-12 октадекадиеновой кислотой (КЛК), улучшает их восстановление после витрификации (Pereira, Marques, 2008). Было показано, что во время культивирования *in vitro* КЛК проникает в клетки преимплантационных эмбрионов КРС, вызывает повышенную текучесть их мембран, а также попадает в ЛГ (Pereira, Marques, 2008). Наше предыдущее исследование показало, что культивирование *in vitro* эмбрионов мышей с ЛК вызывает увеличение общего количества внутриклеточных липидов и степени их ненасыщенности, а также вызывает снижение температуры начала фазового перехода липидов (ФПЛ), но не влияет на их жизнеспособность после процедур медленного программного замораживания и последующего оттаивания (Igonina et al., 2021). Целью данной работы являлось изучение влияния ЛК на эффективность витрификации эмбрионов мышей и их последующее развитие *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте было использовано 17 половозрелых самок и шесть самцов мышей линии CD1 в возрасте от двух до трех месяцев. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).

Самок мышей линии CD1 на стадии проэструс-эструс ссаживали на ночь с фертильными самцами этой же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. Таких самок подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на второй день беременности, в 14 ч. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой Flushing Solution (FertiPro, Бельгия), как описано ранее (Igonina et al., 2021).

Перед витрификацией эмбрионы были разделены на две группы, которые культивировали *in vitro*: 1) контроль ($n = 82$), без добавления ЛК (Merck, Германия) в среду KSOM (Merck, Германия); 2) с добавлением 200 мкМ ЛК ($n = 107$). Данная дозировка выбрана нами исходя из наших предварительных исследований. Согласно нашей предыдущей работы, эта дозировка была оптимальной для развития эмбрионов мышей без криоконсервации (Igonina et al., 2021). Перед добавлением ЛК в среду KSOM его предварительно смешивали с бычьим сывороточным альбумином в соотношении 3 : 1. Культивирование *in vitro* производили на 35 мл чашках Петри (Corning, США) в 20 мкл каплях KSOM в группах по 3–5 эмбрионов под минеральным маслом (Merck, Germany) в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия). Эмбриональное развитие контролировали визуально под микроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). После культивирования эмбрионы из каждой группы фиксировали в 4% параформальдегиде (ХимМед, Россия) на PBS и окрашивали 2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола – DAPI (Merck, Германия): контроль ($n = 35$), группа после ЛК ($n = 39$); оставшиеся эмбрионы криоконсервировали: контроль ($n = 41$), группа после ЛК ($n = 64$).

Для витрификации 2–3 эмбриона помещали в среду FertiCult Flushing (FertiPro, Бельгия), после чего переносили в уравнивающую среду, содержащую 20% фетальной телячьей сыворотки – ФТС (ХимМед, Россия), 7.5% пропиленгликоля – ПГ (ХимМед, Россия) и 7.5% диметилсульфоксида – ДМСО (ХимМед, Россия), на 3 минуты, а затем в среду для витрификации, содержащую 20% ФТС, 16.5% ПГ, 16.5% ДМСО и 0.5 М сахарозы (ХимМед, Россия) на 25 секунд при комнатной температуре. На последнем этапе эмбрионы переносили на Cryotop (Kitazato, Япония) с мини-

мальным количеством среды и сразу же погружали в жидкий азот (LN₂) для хранения.

Для отогрева Cryotop доставали из LN₂ и помещен в среду FertiCult Flushing с добавлением 0.25 М сахарозы при 37°C на одну минуту. После чего, эмбрионы переносили в среду, содержащую 0.15 М сахарозы, на пять минут, а затем промывали средой без криопротекторов и ставили на культуру *in vitro* в 20 мкл каплю среды KSOM в CO₂-инкубатор Galaxy 48R на 24 часа, при тех же условиях, которые были описаны выше. После культивирования эмбрионы из каждой группы фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS и окрашивали DAPI (контроль: $n = 39$, группа после ЛК: $n = 54$).

Окрашивание эмбрионов DAPI до и после витрификации проводили по протоколу, описанному нами ранее (Igonina et al., 2021). Подсчет числа интерфазных ядер и их фрагментов в развивающихся морулах и бластоцистах производили путем визуальной оценки препаратов с применением флуоресцентного микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия), имеющегося в распоряжении ЦКП МАБО СО РАН, с соответствующим кубическим фильтром для окрашивания DAPI.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc.). Доли зародышей, развивающихся до стадии морулы и бластоцисты сравнивали с помощью теста хи-квадрат. Для сравнения данных по числу клеток в эмбрионах и индексу фрагментации использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенного исследования не было выявлено достоверного влияния ЛК на долю развивающихся морул и бластоцист, а также среднее число клеток на эмбрион (табл. 1). Однако в группе, после воздействия ЛК, наблюдалось значительное увеличение ($p < 0.05$) индекса фрагментации ядер по сравнению с контролем (13.2 ± 2.3 и 7.6 ± 1.2 соответственно).

После процедур витрификации/отогрева не было выявлено достоверных различий по доле развивающихся бластоцист между ЛК и контрольной группами (табл. 1). Тем не менее, значительное снижение ($p < 0.05$) среднего числа клеток на эмбрион было обнаружено в группе ЛК по сравнению с контролем (50.1 ± 3.9 и 65.0 ± 4.7 соответственно). Наши результаты также показывают, что витрификация не повлияла на фрагментацию ядер (табл. 1).

Таблица 1. Развитие эмбрионов мышей в культуре *in vitro* до и после витрификации

Культивирование <i>in vitro</i> эмбрионов с 200 мкМ линолевой кислотой (ЛК) до витрификации						
Группы ¹	Число эмбрионов	Число развивающихся эмбрионов, %			Окрашивание DAPI ³	
		морулы	бластоцисты	поврежденные эмбрионы ²	число клеток на эмбрион	фрагментация ядер, %
Контроль	82	22 (26.8)	60 (73.2)	4 (4.9)	28.9 ± 2.6	7.6 ± 1.2
ЛК	107	27 (25.2)	80 (74.8)	12 (11.2)	28.3 ± 2.5	13.2 ± 2.3*

Развитие эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> после витрификации					
Группы	Число эмбрионов	Число развивающихся эмбрионов, %		Окрашивание DAPI ⁵	
		бластоцисты	поврежденные эмбрионы ⁴	число клеток на эмбрион	фрагментация ядер, %
Контроль	41	31 (75.6)	10 (24.4)	65.0 ± 4.7	13.7 ± 2.5
ЛК	64	38 (59.4)	26 (40.6)	50.1 ± 3.9*	16.5 ± 2.9

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

¹ Эмбрионы от каждой самки были случайным образом распределены между двумя группами.

² Число эмбрионов, которые имеют 20% или больше мертвых клеток (доля от общего числа развивающихся эмбрионов).

³ Число эмбрионов, взятых для окрашивания DAPI, составляло 39 в группе, после воздействия ЛК, и 35 в контроле.

⁴ Число эмбрионов, которые имеют 40% или больше мертвых клеток (доля от общего числа развивающихся эмбрионов).

⁵ Число эмбрионов, взятых для окрашивания DAPI, составляло 54 в группе, после воздействия ЛК, и 39 в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что воздействие ЛК при культивировании *in vitro* не влияло на частоту преимплантационного развития мышей. Однако наблюдалось увеличение фрагментации ядер в группе, после воздействия ЛК, по сравнению с контролем. Скорее всего, этот эффект может быть связан с влиянием ЛК, поскольку наша предыдущая работа подтвердила, что та же доза ЛК, добавленная к эмбрионам мышей при культивировании *in vitro*, вызвала возрастание общего количества внутриклеточных липидов в эмбрионах мыши (Igonina et al., 2021). В более раннем исследовании было показано угнетающее действие ЛК на развитие эмбрионов мышей в дозах 223–319 мкМ (Nonogaki et al., 1994). Однако у КРС наблюдалось положительное влияние ЛК в культуре *in vitro* на развитие эмбрионов (Hochi et al., 1999). Эти исследования показали, что природа этих эффектов может зависеть от видовой принадлежности исследуемых животных и дозы ЛК (Nonogaki et al., 1994; Hochi et al., 1999). В частности, на крупном рогатом скоте показано, что с увеличением дозы доля развивающихся эмбрионов сначала увеличивается, а затем уменьшается (Hochi et al., 1999). В другой работе, также выполненной на крупном рогатом скоте, изучали влияние КЛК на эмбрионы; было показано транзитное угнетение их развития при сопоставимых дозах и последующем ослаблении этого эффекта со временем культивирования (Dias et al., 2020). В целом, наши результаты демонстрируют, что ЛК в дозе 200 мкМ оказывает

лишь незначительное, хотя и достоверное, повышение уровня фрагментации ядер в клетках эмбрионов, но отсутствие влияния на развитие эмбрионов мышей.

Между тем, наши результаты демонстрируют, что воздействие ЛК при культивировании *in vitro* сопровождается угнетением развития эмбрионов после их витрификации и последующего отогрева. Несмотря на то, что доля бластоцист была сходной между группами, среднее число клеток на эмбрион было ниже в группе, которую до витрификации культивировали с ЛК. Эти результаты отличаются от данных нашей предыдущей работы, где ЛК в той же дозировке не вызывал изменения качества эмбрионов мышей после медленного замораживания/оттаивания (Igonina et al., 2021). Этот эффект, вероятно, связан с тем, что при медленном замораживании температура начала ФПЛ была ниже после обработки ЛК (Igonina et al., 2021), однако во время витрификации ФПЛ происходит моментально.

Наше исследование показало, что преимплантационные зародыши мышей, после воздействия ЛК, имеют сниженную криотолерантность; эти выводы разнятся с результатами экспериментов, проведенных ранее на различных видах сельскохозяйственных животных (Hochi et al., 1999; Pereira, Marques, 2008; Dias et al., 2020), что можно объяснить существенно меньшим содержанием внутриклеточных липидов у мыши (Amstislavsky et al., 2019). Расхождение между представленными нами данными и предыдущими результатами, полученными на эмбрионах крупного рогатого

скота и свиней можно объяснить видовой спецификой, а также различиями во времени культивирования и используемых дозах ЛК. Мы полагаем, что увеличение уровня ненасыщенности внутриклеточных липидов может положительно повлиять на эффективность криоконсервации эмбрионов КРС и свиней; при этом общее количество внутриклеточных липидов у этих видов существенно не меняется. С другой стороны, относительное возрастание общего количества внутриклеточных липидов было значительным у эмбрионов мыши, культивированных с той же дозой ЛК (Игонина et al., 2021), что может быть причиной снижения результатов криоконсервации в группе ЛК, наблюдаемой в данной работе.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025, бюджетного проекта № 0259-2021-0015 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский придумали и разработали дизайн эксперимента. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.В. Окотруб получали преимплантационные эмбрионы, проводили их витрификацию и отогрев, а также их культивирование *in vitro*. Автор Э.А. Чуйко проводил окрашивание DAPI, подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, С.В. Окотруб и С.Я. Амстиславский участвовали в об-

работке данных. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P.* Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // *Biopreserv. Biobanking.* 2019. V. 17. P. 76–83. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Arena R., Bisogno S., Gasior L., et al.* Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. e2018362118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018362118>
- Dias L., Leme L., Spricigo J., Pivato I., Dode M.* Effect of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2020. V. 55. P. 11–20. <https://doi.org/10.1111/rda.13579>
- Dunning K., Russell D., Robker R.* Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation // *Reproduction.* 2014. V. 148. P. 15–27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>
- Hochi S., Kimura K., Hanada A.* Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae // *Theriogenology.* 1999. V. 52. P. 497–504. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00146-6)
- Igonina T.N., Okotrub K.A., Brusentsev E.Yu. et al.* Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid // *Cryobiology.* 2021. V. 99. P. 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.014>
- Lapa M., Marques C., Alves S. et al.* Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition // *Reprod. Dom. Anim.* 2011. P. 46. P. 904–910. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01762.x>
- Nonogaki T., Noda Y., Goto Y., Kishi J., Mori T.* Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1994. V. 11. P. 482–488. <https://doi.org/10.1007/BF02215713>
- Pereira R., Marques C.* Animal oocyte and embryo cryopreservation // *Cell. Tissue. Bank.* 2008. V. 9. P. 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9075-2>
- Tatsumi T., Takayama K., Ishii S. et al.* Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse // *Development.* 2018. V. 145. dev161893. <https://doi.org/10.1242/dev.161893>
- Walther T., Farese R.* Lipid droplets and cellular lipid metabolism // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Welte M., Gould A.* Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1862. P. 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.07.006>

Linoleic Acid Exposure *in vitro* Affects Vitrification of Mouse Embryos**E. Yu. Brusentsev¹, T. N. Igonina¹, S. V. Okotrub¹, E. A. Chuyko¹, and S. Ya. Amstislavsky^{1, *}***¹Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia***e-mail: amstis@yandex.ru*

The study addresses the effect of *in vitro* culture (IVC) of mouse embryos with 200 μ M linoleic acid (LA), 48 h, on their viability after vitrification. Fluorescence microscopy of DAPI stained embryos showed an increase of nuclear fragmentation in the non-vitrified LA-treated group, and a significant decrease in the number of cells in vitrified embryos 24 h after their warming. Thus, IVC with LA reduces the viability of mouse embryos after vitrification.

Keywords: mice, preimplantation embryos, intracellular lipids, *in vitro* culture, linoleic acid, vitrification

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: НОВЫЕ ДАННЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. В. Е. Дьяконова*

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

**e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.09.2021 г.

После доработки 26.10.2021 г.

Принята к публикации 30.10.2021 г.

Для эволюционной нейробиологии 2021 год связан с большими достижениями в исследованиях, опирающихся на методы полногеномного клеточного секвенирования. Эти исследования позволили существенно продвинуться в понимании целого ряда фундаментальных вопросов. Как и когда появились первые нейроны в эволюции животных? Какими были первые нервные системы базальных Metazoa, и что могло быть унаследовано современным мозгом позвоночных от их древней организации? Почему глутамат стал доминирующим нейротрансмиттером в мозге млекопитающих? Какие гены и каким образом определяют отличия мозга человека от других позвоночных? Как часто в нервной системе разных типов многоклеточных животных наблюдается ко-трансмиссия (использование одним нейроном нескольких классических нейротрансмиттеров)? Анализ изменений теоретических положений эволюционной нейробиологии, которые связаны с обобщениями результатов последних лет, посвящен данный обзор.

Ключевые слова: происхождение нейронов, нейротрансмиттеры, глутамат, ко-трансмиссия, эволюция нервной системы, соматические мутации генома нейронов, глутаматные рецепторы

DOI: 10.31857/S0475145022010086

ВВЕДЕНИЕ

2021 год можно по праву считать переломным в изучении эволюции нервной системы. Сразу несколько важных вопросов были исследованы с невиданным ранее экспериментальным размахом. Как и когда появились первые нейроны в эволюции животных (один или несколько раз)? Какими были первые нервные системы, и что могло быть унаследовано современным мозгом позвоночных от их древней организации? Что было раньше, нейрон или нейротрансмиттер? Почему глутамат, один из самых распространенных внутриклеточных метаболитов, стал доминирующим возбуждающим нейротрансмиттером в мозге млекопитающих? Насколько важно трансмиссионное разнообразие для функционирования нервной системы и как оно менялось в эволюции многоклеточных животных? Интереснейшие исследования ведутся и на вершине эволюционной шкалы позвоночных, на человеке и приматах: с целью понять, какие гены и каким образом определили отличие мозга человека от других позвоночных. Существенно продвинуться в поиске ответов на все эти вопросы удалось благодаря выходу в свет публикаций, результаты которых опираются на относительно недавно по-

явившиеся методы полногеномного и транскриптомного секвенирования, в том числе единичных клеток. Сравнительные исследования, выполненные на представителях большого числа далеких друг от друга таксонов, всегда вызывали интерес, однако они были трудно реализуемыми до появления новых методов, существенно снизивших трудоемкость и затратность секвенирования.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ НЕЙРОНОВ, НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ И НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

Настоящим прорывом стали работы, авторы которых обладают широкой эрудицией, и успешно используют новые методические возможности для решения фундаментальных вопросов биологии. К числу таких работ относятся публикации группы профессора Леонида Мороза (Leonid Moroz) из Университета Флориды (США), который свой интерес к вопросам происхождения нейронов и химической сигнализации связывает с работами выдающегося нейробиолога Д.А. Сахарова (работающего в московском Институте биологии развития РАН), которые вышли еще в

семидесятих—восемидесятих годах прошлого века. Именно Д.А. Сахарову посвящена одна из статей Л. Мороза (Moroz et al., 2021), в которой последовательно проводится верификация многих ранних идей Д.А. Сахарова: “This manuscript is dedicated to the 90th anniversary of Prof. D.A. Sakharov, whose ideas and the book ‘Genealogy of Neurons’ were the driving forces beyond of this manuscript”. Перечислим основные из них.

1. Полигения или множественное происхождение нейронов в эволюции. Полногеномное секвенирование представителей пяти базальных таксонов многоклеточных организмов: гребневиков (Stenophora), губок (Porifera), пластинчатых (Placozoa), стрекующих (Cnidaria) и двустороннесимметричных (Bilateria), дало новые факты в пользу этого предположения. Наличие нейронов подтверждено только у трех из этих таксонов, они обнаружены у стрекующих, билатерий и гребневиков. Последние при этом филогенетически находятся дальше от стрекующих и билатерий, чем таксоны, не имеющие нейроны, а именно Porifera и Placozoa. Первое свидетельство независимого происхождения нейронов у гребневиков было получено еще в 2013 г.: на геномном уровне выявились существенные отличия нервной системы гребневиков от стрекующих и билатерий (Ryan et al., 2013). Нейроны гребневиков, расположенные в мезоглее и эктодерме, отличаются друг от друга по транскриптому и морфологическим особенностям формирования сети, поэтому некоторые исследователи предпочитают говорить о двух нервных системах гребневиков с предположительно независимым происхождением из разных клеток-предшественников (Moroz et al., 2021). Сходные причины позволили говорить и о двух нервных системах стрекующих, расположенных, в отличие от гребневиков, в эктодерме и энтодерме (Moroz et al., 2021). Нервная система билатерий, в свою очередь, на уровне транскриптома и морфологии отличается от нервных систем гребневиков и стрекующих, что позволило предполагать независимость происхождения и эволюции нейронов в этих группах. Фенотипическое сходство нейронов у разных групп при этом рассматривается как пример конвергенции; оно могло развиться под действием движущего отбора при сходных условиях окружающей среды.

На основании полногеномного секвенирования Мороз с соавторами получили данные о транскриптерных системах, используемых представителями базальных филогенетических групп (Moroz et al., 2021). Исследовалось наличие ферментов синтеза, везикулярного переноса и рецепторов, эволюционная дистанция между некоторыми генами рецепторных белков. Полученные данные свидетельствовали о существенном различии химической сигнализации в нервных системах гребневиков, стрекующих и билатерий,

что хорошо согласуется с идеей о независимом появлении нейронов в трех группах метазоа. К числу наиболее консервативных транскриптерных относятся глутамат, NO, АТФ и пептиды. Однако, у книдарий глутаматные рецепторы выявлены у ненейрональных клеток, что отличает их от билатерий и гребневиков, использующих глутамат уже в качестве нейротрансмиттера. Моноамины оказались характерны только для билатерий и книдарий, но не выявлены у гребневиков по данным (Moroz et al., 2021b). Впрочем, транскриптомный клеточный анализ нервной системы гидры (*Hydra vulgaris*) не подтвердил наличие в ней моноаминергических систем (Brunet, Sprecher, 2021). Поэтому на сегодняшний день нейроны моноаминергического фенотипа с большой вероятностью являются изобретением исключительно билатерально симметричных животных.

2. Нейротрансмиттеры были унаследованы от донервных форм межклеточной сигнализации. Это представление, высказанное в середине прошлого века Х.С. Коштоянцем и активно развиваемое Д.А. Сахаровым, Г.А. Бузниковым, В.Я. Бродским (например, Сахаров, 1974; Дьяконова и Сахаров, 2019; Бродский, 2021; Sakharov, 1974; Vuznikov, 2007; Brodsky, 2009) уже можно считать очевидным. Леонид Мороз предлагает более сильное утверждение: “транскриптеры сделали нервную систему” (Moroz et al., 2021). Если бы до появления нейронов не существовало хорошо развитой системы химической межклеточной сигнализации, с готовыми системами рецепции и кальций-зависимой секреции, не было бы необходимого преадаптивного базиса для возникновения нервной системы. Существование такого преадаптивного базиса у донервных многоклеточных также показано в исследованиях группы Мороза (Moroz et al., 2021b), свидетельствующих о наличии развитой системы межклеточной сигнализации и интеграции поведения за счет химической сигнализации у пластинчатых (Placozoa). Эта серия исследований стала также весомым доказательством еще одной гипотезы Д.А. Сахарова.

3. Возможность несинаптической генерации поведения группой клеток с разной химической сигнализацией. Исходно эта гипотеза была сформулирована для группы, или точнее ансамбля, нейронов, отвечающих за генерацию определенного моторного поведения (например, бега, жевания). Еще в 70-х гг. прошлого века стало известно, что такое поведение не является производным рефлекторных дуг, а формируется благодаря скоординированной работе ансамбля центральных нейронов. Такие ансамбли получили название центральных генераторов паттерна (ЦГП). Но как организована скоординированная работа нейронов в ЦГП? И каким образом происходит координация разных ЦГП? Д.А. Сахаров предположил, что координация активности нейронов в ЦГП мо-

жет происходить за счет секреции разных трансмисмиттеров нейронами разных фаз и наличия разного набора рецепторов к трансмисмиттерам другим нейронам. Позже появились данные, свидетельствующие о том, что изменение концентрации одного нейротрансмисмиттера может координировать и более сложное поведение, основанное на согласованной работе разных ЦГП. Подробнее обо всем этом можно посмотреть, например (Дьяконова, Сахаров, 2019).

Изучение особенностей биологии, поведения, физиологии и генетики представителей Placozoa (*Trichoplax*, *Hoilungia hongkongensis*) группой Л. Мороза и, главным образом, его ученицы Дарьи Романовой стало весомым подтверждением этой идеи (Moroz et al., 2021b; Romanova et al., 2020, 2021). Placozoa относят к донервным многоклеточным организмам. Они способны к направленной локомоции, достаточно сложно организованному пищевому поведению, избеганию. Геномный анализ выявил десятки систем межклеточной сигнализации и их компонентов, включающих и ферменты синтеза сигнальных молекул, и рецепторы к ним. Среди них обнаружены классические нейротрансмисмиттеры (глутамат, ГАМК), большое число пептидов, оксид азота. Транскриптомика единичных клеток показала, что разные типы клеток используют для сигнализации разные секреторные молекулы и имеют разный спектр рецепторной чувствительности. Фармакологические эксперименты доказали координирующую роль некоторых из этих сигнальных молекул в организации поведения трихоплакса. Короткий обзор этих результатов приводится в статье Л. Мороза с соавторами (Moroz et al., 2021b). На них основывается предположение о несинаптической организации первых нервных систем в эволюции и более позднем появлении синапсов, причем также множественном и независимом появлении в разных таксонах.

4. Идея о происхождении нейронов из секреторных клеток обсуждается сразу в двух статьях той же группы, опубликованных журналом *Frontiers in Molecular Neuroscience* в тематическом выпуске, посвященном неканоническим эффектам нейротрансмисмиттеров (Moroz, 2021; Romanova, Moroz, 2021). К числу таких неканонических (с точки зрения классических нейрофизиологов) функций относят сигнализацию в ненервных тканях, прямые модификации белков и гистонов (например, аминирование), гормональные эффекты. Однако при рассмотрении в эволюционной перспективе эти явления, напротив, приобретают каноничность, становится очевидным, что они существовали задолго до появления нейронов и нервной системы в эволюции. Более того они могли определить выбор того или иного трансмисмиттера для выполнения разных функций в мозге.

Наличие паннексинов в геноме донервных организмов позволяет предположить, что секреторные клетки научились использовать их не только в качестве щелевых контактов, но и для активной несинаптической секреции таких веществ как АТФ, глутамат и др. в межклеточное пространство для ускорения обмена сигналами. То есть основа будущих электрических синапсов также могла быть унаследована нейронами от их активно секреторирующих предшественников. Интересно, что это относительно недавно открытая несинаптическая секреторная функция паннексинов/коннексинов также сохранилась и у современных позвоночных (Moroz et al., 2021b).

Формирование нейронов из секреторных клеток обсуждается и в работе “The chemical brain hypothesis for the origin of nervous systems” (Jékely, 2021). С необходимостью синхронизации, координации и повышения эффективности секреции сенсорно-нейросекреторными клетками Дж. Жекели связывает появление первых синаптических контактов, позволяющих объединить клетки в единую секреторирующую сеть. При этом Жекели рассматривает не просто секреторные, а *сенсорные* секреторные клетки, что согласуется с данными нейробиологии развития: в онтогенезе первичноротых самые первые нейроны, называемые пионерными (*pioneer neurons*), представлены именно сенсорными клетками с несинаптической секрецией (Nezlin, Voronezhskaya, 2017). Такими характеристиками обладают пионерные нейроны у представителей разных таксономических групп, тогда как их трансмисмиттерная специфичность может быть разной (Nezlin, Voronezhskaya, 2017).

Вопрос о том, какие именно особенности секреторных клеток стали необходимым условием для появления настоящих нейронов и синаптической секреции, рассматривается в недавней статье Романовой и Мороза (Romanova, Moroz, 2021). Авторы предполагают, что специализация эндоплазматического ретикулума (ЭР) в направлении увеличения секреторной способности клетки и связанное с этим увеличение внутриклеточных мембранных структур могут быть теми факторами, которые запустили и сформировали раннюю нейрональную и синаптическую эволюцию. Интересно, что при нейрогенезе мембранные синаптические пузырьки присутствуют в растущих аксонах и их окончаниях еще до того, как сформируются настоящие синапсы (Sukhinich et al., 2021). Можно предположить, что развитие нейрона воспроизводит последовательность этих событий в эволюции.

Статью Мороза о происхождении нейронов из секреторных клеток разного химизма в журнале *Frontiers* (Moroz, 2021) смело можно назвать программной. В ней много внимания уделяется перспективам развития “новой” нейробиологии, ос-

нованной на представлениях о множественном происхождении нейронов и изучении эволюции “химического языка” нервной системы. Автор предполагает, что сравнительная транскриптомика нейронов у малоизученных таксонов многоклеточных животных позволит построить своего рода периодическую систему, в которой свойства нейрона будут предсказываться его генеалогическим положением. О том, что сейчас мы находимся в самом начале этого пути, говорит тот факт, что из 36 современных типов многоклеточных животных нейрональные сигнальные системы относительно хорошо исследованы только у 5 (Chordata, Arthropoda, Nematoda, Mollusca, Annelida). Возможности, которые открывает это направление исследований, хорошо иллюстрируются следующей статьей той же группы, посвященной эволюции самого распространенного нейротрансмиттера – глутамата.

КАК ГЛУТАМАТ СТАЛ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОМ?

Глутамат занимает особое положение среди других сигнальных молекул сразу по нескольким причинам (Moroz et al., 2021a). Во-первых, большинство нейронов головного мозга млекопитающих использует в качестве нейротрансмиттера глутамат, хотя существует более 20 других нейротрансмиттеров с низким молекулярным весом. Не удивительно, что около половины современных нейробиологов изучают различные аспекты глутаматергической передачи. Во-вторых, сравнительные исследования указывают на глутамат как на один из самых ранних трансммиттеров: глутаматные рецепторы выявлены группой Мороза и другими авторами практически у всех исследованных на сегодняшний день многоклеточных организмов, включая водоросли и растения, а также у одноклеточных эукариот (Moroz et al., 2021a). В-третьих, те же сравнительные исследования показывают, что глутамат, заняв лидирующее положение в мозге млекопитающих, по-видимому, утратил у них ряд функций и рецепторов, разнообразие которых, например, у многих первичноротых беспозвоночных животных выше. Так, у моллюсков, нематод, насекомых глутамат оказывает не только возбуждающее, но и тормозное действие, связываясь с пентамерными рецепторными каналами с *суз*-петлями. L-глутамат является *периферическим* нервно-мышечным нейротрансмиттером у большинства животных на планете, но не у млекопитающих (у которых эту функцию выполняет, как известно, ацетилхолин, а глутамат становится основным трансммиттером *центральной* нервной системы). Наконец, в отличие от моноаминов и ацетилхолина, открытых в качестве нейротрансмиттеров существенно раньше, глутамат настолько распространенный кле-

точный метаболит, что исследователи долго ставили под сомнение саму возможность выполнения им трансммиттерной функции. Проблема заключается в его низкой специфичности и отсутствии специализированной системы синтеза, характерной для других трансммиттерных систем. Глутаматергический нейрон обладает эргичностью, то есть трансммиттерной специфичностью, в несколько ином смысле, чем, например, моноаминовые, пептидергические или ацетилхолиновые нейроны. Если для последних характерна специализированная система ферментов синтеза, везикулярного захвата и выброса, специфичная только для одного типа клеток, то глутаматный нейрон становится таковым только за счет экспрессии гена глутаматного транспортера, закачивающего глутамат в везикулы – синаптические пузырьки. Не здесь ли ниточка, потянув за которую, можно распутать большой клубок вопросов? Авторы обсуждаемой статьи считают, что да. Что разгадывать интересную задачку о происхождении трансммиттерной функции глутамата и ее дальнейшей эволюции нужно начинать с рассмотрения роли этой аминокислоты во внутриклеточном метаболизме (Moroz et al., 2021a).

Было проведено сравнение метаболомов прокариотической клетки (*E. coli*) и клетки млекопитающего (культура клеток мыши iBMK – Immortalized Baby Mouse Kidney Epithelial Cells). Оказалось, что в обоих случаях глутамат является основным внутриклеточным метаболитом, его концентрация в клетке превышает концентрацию других молекул. Абсолютные внутриклеточные концентрации глутамата достигают 96 мМ для бактерии и 64 мМ для клетки млекопитающего, что составляет 37 и 35% всех метаболитов. С большим отрывом следует глутамин (9%), опережая при этом АТФ (3%). Интересно, что половину всего метаболома составляют эволюционно консервативные “пан-сигнальные” молекулы (Moroz et al., 2021a).

Глутамат участвует сразу в нескольких основных метаболических путях клетки. Он является критически важным метаболитом при получении энергии (цикл Кребса), ассимиляции азота и синтезе аминокислот. И глутамат, и глутамин являются донорами азота для аминокислот, участвуют в механизмах трансаминирования. Все ферменты перечисленных выше метаболических путей высоко консервативны. Синтез низкомолекулярных сигнальных веществ (ГАМК, аспартата, N-ацетил-1-аспартата, глицина и NO) также неразрывно связан с метаболизмом глутамата и клеточной биоэнергетикой. Эти сигнальные вещества могут синтезироваться как промежуточные продукты метаболизма почти каждой прокариотической и эукариотической клеткой.

Идея о том, что глутамат мог быть первым трансмиттером, повышение концентрации которого в межклеточной среде сигнализировало о повреждении клетки, была озвучена Леонидом Морозом уже более 10 лет назад. Тогда она казалась интересной, но трудно доказуемой, интуитивной. Однако новые данные о метаболизме клеток далеких в эволюционном отношении организмов существенно изменили эту ситуацию.

Очевидно, что нарушение целостности любой клетки приводит к появлению в межклеточном пространстве самых разных метаболитов, но другим клеткам для выявления такого события проще настроиться на самый сильный и универсальный сигнал. Глутамат может смело претендовать на роль такого сигнала. В мире одноклеточных организмов специфический химический сигнал, информирующий о погибающей клетке, может быть важным пищевым стимулом. У многоклеточных повышение концентрации глутамата в межклеточном пространстве становится уже сигналом, указывающим на неблагоприятные события в организме. Биологическая значимость этой информации очень высока. Поэтому неудивительно, что уже на самых ранних этапах эволюции (по оценкам Л. Мороза с соавторами, 3.5 миллиарда лет назад), появляются системы распознавания экстраклеточного глутаматного сигнала, а именно глутаматные рецепторы. Здесь трудно удержаться и не напомнить, что обе анцестральные функции глутамата, выявленные еще у донервных многоклеточных организмов Placozoa, сохранились у млекопитающих несмотря на долгую полную событий эволюцию. Достаточно вспомнить про хорошо известный усилитель вкуса, глутамат натрия, взаимодействующий со специализированными глутаматными рецепторами, отвечающими за вкусовые ощущения, называемые “умами”.

Анализу эволюции генов глутаматных рецепторов посвящена значительная часть работы Л. Мороза с коллегами. Предполагается, что различные типы анцестральных глутаматных рецепторов у общего предка многоклеточных животных (Urmetazoa) могли активироваться разными лигандами, включая глицин, глутамат и другие аминокислоты, как это показано, например, у современных растений и прокариот. Другими словами, эти рецепторы исходно могли быть универсальными аминокислотными сенсорами, и отчасти эта их функция сохранилась и у многоклеточных животных. Однако, относительно высокие концентрации высвобожденного внеклеточного глутамата (по сравнению с другими аминокислотами) могли сделать эти рецепторы функциональными рецепторами глутамата — аналогично рецептору iGluR, описанному у растений.

Полученные данные по филогении глутаматных рецепторов эукариот предполагают, что одними из старейших могут быть лямбда-рецепторы. Примечательно, что они были идентифицированы только у губок (Porifera). Пока неизвестно, являются ли эти рецепторы эволюционной инновацией губок или потерялись со временем в других таксонах животных. Рецепторы NMDA-типа, обеспечивающие такие явления как долговременная потенция (LTP) и обучение у позвоночных, выявлены и у многих беспозвоночных с похожими (Rosenegger, Lukowiak, 2010) и новыми (Dyakonova, 2003; D'iakonova T.L., D'iakonova V.E., 2010) функциями. За пределами Metazoa NMDA рецепторы не обнаружены, а среди Metazoa, их не нашли у гребневиков и губок (Moroz et al., 2021a). Всего у эукариот были идентифицированы двадцать две различные филогенетические линии глутаматных рецепторов.

Если рецепторы глутамата найдены у всех изученных организмов, то везикулярные транспортеры, как и следует ожидать, — не у всех. Они не выявлены у губок, гребневиков и хоанофлагеллят. Число разных рецепторов и транспортеров глутамата, как оказалось, не коррелирует с эволюционной продвинутостью и сложностью нервных систем Metazoa. Так, у кишечнополостных (стрекающих) найдено 15 генов разных глутаматных рецепторов и 10–17 генов разных везикулярных транспортеров глутамата, причем большинство из них экспрессируются не в нейронах. Наибольшее разнообразие глутаматных рецепторов (26) обнаружено у брюхоногих моллюсков. Для сравнения: у млекопитающих найдено 18 рецепторов и 3 транспортера. Даже поверхностный обзор функций нейронального глутамата также выявляет существенные различия между крупными таксонами, такими как моллюски, насекомые, хордовые, стрекающие. Это может указывать на параллельную эволюцию глутаматергической системы или, правильнее, систем в этих линиях. У членистоногих глутамат — основной нейромедиатор, у моллюсков он представлен во всех типах нейронов (сенсорных, интернейронах и мотонейронах), у млекопитающих глутамат не встречается в нейромускульных контактах (только в сенсорных и центральных нейронах), где оказывает только возбуждающие эффекты. О функциях глутамата у растений и водорослей (красных и бурых) известно, что это участие в осморегуляции, регенерации, реакциях на повреждение, хемосенсорике.

ПОЧЕМУ МОЗГ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИСПОЛЬЗУЕТ ГЛУТАМАТ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО ВОЗБУЖДАЮЩЕГО НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА?

Существенные отличия в количественной представленности глутаматергических нейронов видны в пределах группы билатерально-симметричных животных. У первичноротых только 5–10% нейронов использует глутамат в качестве нейротрансмиттера. ЦНС позвоночных увеличивалась в значительной степени за счет повышения доли глутаматных нейронов. Так у грызунов эта доля составляет уже 50%, а у человека она достигает 80%.

Почему увеличение мозга в ряду позвоночных происходило благодаря формированию большего числа именно глутаматных нейронов? Мороз и соавторы (Moroz et al., 2021) отвечают на этот вопрос так. Во-первых, очень низкая энергетическая стоимость производства. Энергия, расходуемая на захват и синтез глутамата, у грызунов составляет всего 2–3% от общих затрат, связанных с передачей сигналов, и 5% – у людей; кроме того, глутамат сам может быть источником энергии. Во-вторых, это может объясняться более простым генетическим и метаболическим механизмом получения глутаматергической клетки: все, что требуется для того, чтобы нейрон стал глутаматергическим, это активация экспрессии везикулярного глутаматного транспортера.

В дополнение к идее Л. Мороза можно предположить, что распространенность глутаматергических нейронов в мозге позвоночных отражает “поспешность” его эволюции: объем наращивался быстро, простыми и максимально экономными способами. Вероятно, было найдено универсальное решение для увеличения размеров мозга за счет числа нервных клеток (а не их размера как, например, у некоторых моллюсков), и использования для этой цели самой энергетически дешевой и простой глутаматергической сигнализации.

Если это действительно так, то одна из проблем химической школы Коштыянца-Сахарова, которую можно назвать “кошмаром” этой школы, похоже, близка к своему разрешению. Повышение химической однородности нейронов в мозге наиболее продвинутых в когнитивном отношении организмов казалось противоречило основному постулату школы о значимости для работы нервной системы мультитрансмиттерности и химического разнообразия. Сейчас мы видим, что в эволюции мозга позвоночных химическое разнообразие нейронов не уменьшалось: в ЦНС человека найдены практически все известные нейротрансмиттеры. Однако на определенных этапах развития нервная система, по-видимому, была “вынуждена” стремительно увеличивать число нейронов, и “научилась” это делать

самым простым, быстрым и энергетически выгодным способом. Экономия времени и энергии привела к существенному преобладанию нейронов одного трансмисмиттерного фенотипа.

Второй, не менее интересный вопрос о том, почему именно возбуждающие рецепторы сохранились в мозге млекопитающих, мало обсуждается в статье. В этом контексте интересны следующие факты. Возбуждение нейронов на физиологическом уровне создает условия для выхода из устойчивых состояний, возможности быстрого формирования новых констелляций нейронов. Но еще большая пластичность и разнообразие может достигаться за счет повышения пластичности, открытости генома, регуляции его экспрессии. Недавно была показана связь физиологического возбуждения с повышением деметилирования генома нейронов гиппокампа (Grassi et al., 2017). Введение хлорида калия, вызывающего неспецифическое повышение электрической активности нейронов, изменило экспрессию нескольких тысяч генов, при этом примерно у 90% наблюдалось активное деметилирование, и только у 10% – обратный эффект. Несколько типов возбуждающих глутаматных рецепторов активирует пути, ведущие к повышению экспрессии универсального релаксера гетерохроматина *GADD45* и деметилированию (Sultan, Sweatt, 2013). Учитывая высокую консервативность этих путей и формирование глутаматных рецепторов на ранних этапах эволюции, можно предположить, что рискованный выбор в пользу возбуждающих глутаматных рецепторов был связан с возможностью “перетряхивать” не только устойчивые функциональные ансамбли клеток, но и их транскриптомы, создавая базу для высокой пластичности и поиска нового.

Почему такой выбор можно назвать рискованным? При возбуждении нейрона активируется метаболизм, повышается выброс свободных радикалов, потенциальных мутагенов. А если при этом еще и снижается защищенность генома за счет деконденсации хроматина и деметилирования ДНК, то риск приобретения мутаций возрастает. Эксайтотоксичность глутамата (патологии нервной системы, связанные с избыточной активацией возбуждающих глутаматных рецепторов) давно известна на физиологическом уровне, ей посвящено колоссальное число неврологических исследований. Связь с накоплением мутаций пока меньше изучена. Однако выдающаяся по сравнению с другими клетками способность корковых нейронов позвоночных (напомню, что 50–80% из них глутаматергические), накапливать мутации показана уже в ряде работ и не вызывает сомнений (Evrony et al., 2012; Hazen et al., 2016; Wu et al., 2021). Более того, активность генов, связанных с регуляцией нейронального возбуждения, обратно коррелирует с продолжительностью жизни у человека и нематоды (Zullo et al., 2019). Было высказано

зано предположение, что именно накопление мутаций и их косвенный “подсчет” лежит в основе этого отрицательного влияния возбуждения на продолжительность жизни (Dyakonova et al., 2020).

Итак, увеличение числа нейронов и использование преимущественно глутамата в качестве регулятора как возбудимости нейронов, так и деметилирования их генома могло способствовать повышению и вычислительной мощности, и пластичности нервной системы. Платой оказался повышенный риск накопления мутаций. Противодействовать этому неблагоприятному фактору, в свою очередь, можно увеличивая избыточность клеток, повышая “копийность” генома. Увеличение числа нейронов может служить не только усложнению системы, но и ее защите при случайном мутагенезе. Использование возбуждающей глутаматной сигнализации тогда могло также подстегнуть быстрое увеличение размеров мозга в эволюции позвоночных. Сходные рассуждения, еще без конкретной атрибуции к глутамату и его влиянию на геном, были высказаны в работе о возможной эволюции мозга в условиях информационной платы за когнитивный успех (Крушинский, 2014).

КАКИЕ УЧАСТКИ ГЕНОМА И КАК ОПРЕДЕЛИЛИ ОТЛИЧИЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Вопрос, давно интересовавший не только эволюционных нейробиологов, но гораздо более широкие слои человеческой популяции: что делает мозг человека человеческим, отличным от других позвоночных. Сравнительная геномика и транскриптомика последних лет (2018–2021) также позволили совершить значительные открытия в этой области. Начнем с того, что поиск регуляторных функций участков генома, специфичных для человека и обладающих высокой скоростью эволюции, привел к ожидаемому результату – подавляющее большинство из них регулируют развитие нервной системы (Girskis et al., 2021). Эти данные позволяют сделать довольно важный вывод: именно изменения в нервной системе сделали человека человеком. Очевидно, что понимание конкретной роли разных отделов генома, связанных с регуляцией развития нервной системы, придет намного позже. Пока удалось немного разобраться с тем, почему в онтогенезе коры головного мозга человека получается больше нейронов, чем у других позвоночных, и какие факторы определяют отличия в формировании префронтальной коры человека, области мозга с наиболее быстрым эволюционным развитием.

Показано, что одним из механизмов увеличения числа нейронов оказывается замедление перехода нейрональных прогениторных клеток к дифференцировке, позволяющее им совершать

дополнительные циклы митоза перед дифференцировкой (Fiddles et al., 2018). Увеличение площади коры головного мозга современного человека могло быть обеспечено частичной дубликацией гена *notch2*, существующего у других приматов. Эта древняя неполная дубликация с изменением последовательности гена привела к появлению гена *notch2nl*, продукт которого влияет на развитие нейрональных прогениторных клеток коры. Этот ген претерпел еще две дубликации, и современный человек в результате имеет три копии этого гена. Результат в очередной раз подтвердил роль дубликаций в эволюции позвоночных (Baigamov et al., 2021). Повышение экспрессии *notch2nl* ведет к замедлению дифференцировки прогениторных клеток и увеличению числа нейронов, как показано в экспериментах на культуре клеток и мозговых органоидах (Fiddles et al., 2018). Интересно, что эта область генома отличается нестабильностью и у современных людей, встречаются геномы с числом копий *notch2nl* две и четыре, в первом случае развивается микроцефалия, во втором – макроцефалия (Fiddles et al., 2018). Есть еще один ген, существенно изменивший клеточный паттерн и уровень экспрессии за счет изменений в последовательности регуляторных участков генома, специфичных для человека. Это ген белка PPP1R17, вызывающего замедление клеточного цикла нейрональных предшественников, наблюдаемое в онтогенезе приматов и в еще большей степени человека, существенно изменил клеточный паттерн и уровень экспрессии у человека за счет изменений в последовательности регулирующих участков генома, специфичных для человека (Girskis et al., 2021).

Недавним открытием стала также демонстрация экспрессии серотонинового рецептора HTR2A базальными предшественниками нейронов радиальной глии у человека как одного из факторов замедления дифференцировки базальных предшественников и увеличения числа нейронов (Xing et al., 2020). Однако эти различия определили отличие не только человека, но и других позвоночных, обладающих выраженной складчатостью коры по сравнению с теми, у которых кора более гладкая (что отражает меньшее число нейронов и меньшую площадь коры). Экспрессия этого рецептора определяет зависимость числа нейронов от концентрации серотонина в онтогенезе, и участвует в механизме формирования контекст-зависимых индивидуальных различий.

Громким последним событием в этой области, можно считать две статьи, вышедшие в октябре в Nature (Shibata et al., 2021a, 2021b), сообщившие об определяющем участии ретиноевой кислоты (производного витамина А) в нейрогенезе префронтальной коры (ПФК) человека. Авторы занимались поиском эволюционных механизмов расширения ПФК и ее связей с медио-дорсальным таламусом у

приматов и человека. Считается, что ПФК отвечает за познавательную деятельность, когнитивную пластичность, самоконтроль, рабочую память, социальные взаимодействия. Морфологическими маркерами ПФК приматов и человека является латеральное расширение и увеличение четвертого зернистого (гранулярного) слоя. Онтогенетические механизмы, определяющие эти особенности оставались до последнего времени неизвестными.

Используя данные секвенирования РНК BrainSpan человека (RNA-seq), авторы провели скрининг генов, которые дифференциально активируются в средней части лобной доли плода на 16–22 нед. после зачатия. Исследованные области включали четыре предполагаемых области ПФК (медиальная, орбитальная, дорсолатеральная, вентролатеральная) и первичную моторную кору. Экспрессия генов в этих лобных областях сравнивалась с областями теменной (первичная сенсорная кора, S1C; нижняя теменная кора, IPC) и височных долей (первичная зрительная кора, V1C) и височных долей (первичная слуховая кора, A1C). Анализ геной онтологии (GO) генов, дифференциально активированных во фронтальных областях, выявил следующие категории генов: “чувствительные к ретиноевой кислоте”, “связанные с образованием синапсов” и “ответствующие за развитие аксонов”. Используя иммуноферментный анализ (ELISA), авторы оценили концентрацию ретиноевой кислоты в развивающемся мозге, и обнаружили выраженный градиент в передне-заднем направлении с максимальными значениями в лобных отделах. Экспрессия ферментов синтеза ретиноевой кислоты была также выше в лобных отделах, и значимо отличалась у приматов (человек и макака) от уровня экспрессии в лобных отделах грызунов (мышей). Концентрация ретиноевой кислоты регулируется также ферментом CYP26B1, катаболизирующим ретиноевую кислоту и тем самым ограничивающим ее сигнализацию. Экспрессия этого фермента, напротив, выше в каудальных областях по сравнению с префронтальными, что также может служить формированию передне-заднего градиента ретиноевой кислоты. Лактоза-зависимое нокаутирование соответствующего гена в перинатальной лобной коре у мышей привело к росту концентрации ретиноевой кислоты, умеренному увеличению передних отделов, повышенной экспрессии гена *rorb*, характерного для четвертого гранулярного слоя ПФК антропоидных приматов, но экспрессирующегося в норме у мышей, и расширению медиальной таламокортикальной иннервации.

Было изучено развитие мозга у мышей линии, несущей делецию гена фермента CYP26B1, участвующего в деградации ретиноевой кислоты. Оказалось, что сигнальный каскад ретиноевой кис-

лоты (работающий через рецепторы RXRG и RARB) необходим для корректной предразметки префронтальной и моторной областей мозга, а также для формирования связи между ПФК и медуллярным таламусом. Эти данные впервые свидетельствуют о том, что каскад ретиноевой кислоты играет критическую роль в развитии ПФК и в ее расширении в ходе эволюции головного мозга позвоночных.

Интересно, что градиент концентрации ретиноевой кислоты сходен с градиентом плотности дендритных шипиков, которая также уменьшается в передне-заднем направлении, и особенно высока в префронтальной коре человека по сравнению с другими млекопитающими. Сравнив транскриптомы человека и макаки на стадии среднего плода, совпадающей с началом синаптогенеза, авторы обнаружили достоверное увеличение экспрессии церебеллина 2 (*CBLN2*), нейрексина (*NRXN*) и белка-синаптического организатора, связанного с GRID/GluD-рецептором глутамата (Shibata et al., 2021b). Видовые различия в уровне экспрессии и распределении в коре церебеллина, по крайней мере частично, оказались обусловленными делециями, содержащими сайты связывания SOX5 в энхансере *cbln2*, реагирующем на ретиноевую кислоту. “Генетическое очеловечивание” энхансера мышиногено *cbln2 in situ* (т.е. его замена на человеческий) вызывает повышенную экспрессию *cbln2* и способствует образованию дендритных шипиков в ПФК.

Таким образом, выяснилось, что изменение не только концентрации ретиноевой кислоты, но и чувствительности к ней энхансера церебеллина, может отвечать за специфичное развитие ПФК человека и выраженный передне-задний градиент плотности дендритных шипиков. Вопрос же о причинах различий в концентрации и распределении ретиноевой кислоты у приматов остается открытым.

КО-ТРАНСМИССИЯ – ПРАВИЛО ИЛИ ИСКЛЮЧЕНИЕ?

Еще одним хорошим примером возвращения к старым вопросам на новом уровне развития науки является работа, опубликованная журналом *Frontiers in Molecular Neuroscience* в феврале 2021 г. (Brunet, Sprecher, 2021). Статья полностью лишена экспериментальной составляющей, она выполнена на основе данных, опубликованных другими исследователями. Быстро набирающее скорость секвенирование транскриптомов единичных клеток привело к тому, что в свободном доступе находятся данные о понейронно отсекуемых нервных системах уже многих видов животных. Этими данными воспользовались швейцарские исследователи, чтобы окончательно разобраться с тем, как часто в нервной системе наблюдается ко-

трансмиссия (использование одним нейроном нескольких нейротрансмиттеров) на широкой эволюционной шкале. Кроме того, на некоторых видах им удалось проверить, может ли в ходе онтогенеза изменяться число нейронов с колокализацией нескольких нейротрансмиттеров. Были использованы данные по транскриптомам нейронов гидры (*Hydra vulgaris*), головного ганглия планарии (*Schmidtea mediterranea*), нервной системы нематоды (*Caenorhabditis elegans*), головного мозга личинки и взрослой мухи (*Drosophila melanogaster*), головного мозга представителя туникат (низшие хордовые, с подвижной личинкой и сидячим образом жизни у взрослых особей) асцидии (*Ciona intestinalis*), костистой рыбы (*Danio rerio*), конечного мозга рептилий (черепахи *Trachemys scripta* и ящерицы *Pogona vitticeps*) и, наконец, головного мозга представителя млекопитающих мыши (*Mus musculus*). Изучали случаи колокализации только классических нейротрансмиттеров (глутамат, ацетилхолин, ГАМК, глицин, моноамины), используя наличие в транскриптомах нейронов мРНК генов — маркеров определенного трансмиссионного фенотипа. Продукты этих генов-маркеров, как правило, отвечают за синтез и/или везикулярный перенос соответствующих сигнальных молекул.

Часто ко-трансмиссию рассматривают как нарушение принципа Дейла, сформулированного в пятидесятые годы прошлого века. Тогда оно имело значение, сходное по значимости с выводом Рамона Кахаля о том, нервная система — это не синцитий, а совокупность отдельных нервных клеток. Принцип Дейла усиливал представление о независимой сущности нейрона. Однако у самого принципа Дейла существует два разных прочтения. Согласно упрощенному варианту этого принципа, один нейрон может использовать только один нейротрансмиттер, который секретируется всеми его окончаниями. Часть исследователей интерпретирует этот принцип иначе: набор нейротрансмиттеров для всех секретирующих областей одного нейрона постоянен. О том, что принцип Дейла в упрощенном варианте нарушается, было известно давно. Существуют примеры колокализации классических нейротрансмиттеров с нейропептидами, газообразными сигнальными молекулами и у первично-, и у вторичноротых животных. Функциональное значение такой колокализации также изучалось и обсуждалось. Но вот то, насколько это явление характерно для классических нейротрансмиттеров, оставалось не совсем ясным. Ко-трансмиссия — это экзотика или правило для нервной системы?

Сторонники химической организации мозга рассматривали колокализацию нейротрансмиттеров, скорее, как исключение из правила. Предполагалось, что она либо нужна в редких случаях для специальных целей, либо отражает случайное “недоформирование” трансмиссионной специфич-

ности. Эта точка зрения вполне понятна, если исходить из того, что разные нейротрансмиттеры имеют разные функции, несут разную смысловую нагрузку. В этом случае колокализация не может быть правилом для нервной системы.

Итак, что же выяснилось благодаря клеточной транскриптомике? Перечислим коротко основные результаты этой работы.

Большинство нейронов у всех исследованных видов экспрессирует маркеры только одного нейротрансмиттера.

Нейротрансмиссионный профиль нервной системы существенно отличается у разных видов. Например, у гидры классические нейротрансмиттеры представлены ацетилхолином и ГАМК; у рептилий основным нейротрансмиттером является глутамат, и, в меньшей степени, ГАМК; у мышей это соотношение меняется на обратное (ГАМК преобладает над глутаматом), и к тому же существенно возрастает доля моноаминергических нервных клеток.

Для всех исследованных видов колокализация классических нейротрансмиттеров неизменно выявляется примерно у 10–25% нейронов. При этом в 50% случаев (и больше) минорные нейротрансмиссионные фенотипы (более редкие) могут быть представлены нейронами, синтезирующими еще один или даже несколько классических нейротрансмиттеров.

Зависимость частоты колокализации от филогенетического расстояния между организмами не выявлена.

В онтогенезе число мультитрансмиссионных нейронов может меняться. Например, в нервной системе взрослых дрозофил значимо снижается доля мультитрансмиссионных клеток по сравнению с нервной системой личинки. С другой стороны, у старых мышей она существенно не меняется по сравнению с молодыми.

Кластерный анализ транскриптомов отдельных нейронов (методом Uniform manifold approximation and projection, UMAP) не выделяет клетки с колокализацией нейротрансмиттеров в отдельные группы, как правило, они входят в кластеры нейронов, секретирующих один из ко-трансмиссионных нейротрансмиттеров. С другой стороны, не у всех видов проявляется и четкая кластеризация монотрансмиссионных клеток.

Таким образом, оказалось, что с одной стороны, большинство нейронов у всех исследованных видов использует только один классический нейротрансмиттер, а нейроны с ко-трансмиссией принадлежит к кластерам нейронов, вырабатывающих один из ко-трансмиссионных, что согласуется скорее со случайным появлением этих клеток. Уменьшение доли колокализаций при переходе от личиночного к взрослому мозгу также согласуется с представлениями о ко-трансмиссии клас-

сических медиаторов как о случайном недоформировании транзиттерной специфичности. С другой стороны, доля нейронов с колокализацией все-таки велика для случайной, и оказалось, что даже 30% таких нейронов у личинки дрозофилы не мешает работе нервной системы.

В заключение подведем основные итоги этого насыщенного новыми результатами и идеями года эволюционной нейробиологии. Нейроны с большой вероятностью появлялись в эволюции несколько раз. Необходимой преадаптацией к их появлению было наличие развитой системы межклеточной химической сигнализации, включающей элементы везикулярной секреции, рецепторы и мембранные каналы, образованные паннексинами. Транзиттерная гетерогенность секреторирующих клеток и первых нервных систем была необходимым условием координации поведения организма на основе объемной несинаптической секреции транзиттеров (volume transmission). Эти древние черты сохранились и в нервной системе современных млекопитающих, характеризующейся большим разнообразием химической межнейрональной сигнализации. Большинство нейронов у всех исследованных животных, представителей типов кишечнополостных, хордовые, насекомые, моллюски, аннелиды, использует только один из классических нейротранзиттеров. Однако нейроны с ко-трансмиссией также неизменно выявляются у всех исследованных видов и составляют примерно 10–25% от всех нейронов организма. Глутамат, будучи самым распространенным клеточным метаболитом, по-видимому, является одним из первых сигнальных факторов повреждения или гибели клетки. Для узнавания этого биологически-значимого сигнала могли сформироваться первые глутаматные рецепторы. Простота и энергетическая дешевизна формирования глутаматергической сигнализации, по-видимому, определила использование глутамата как основного транзиттера при быстром увеличении числа нейронов в эволюции мозга позвоночных. Донервные или неканонические функции нейротранзиттеров могли определить их разнообразные функции в нервной системе. Так, прямое или опосредованное влияние возбуждающих рецепторов глутамата на состояние хроматина, по-видимому, было использовано для повышения не только физиологической, но и генетической пластичности мозга позвоночных.

Судя по темпам текущих исследований, 2022 г. принесет не менее значимые и интересные результаты в области эволюционной нейробиологии. Анонсы некоторых из них уже прозвучали в личных сообщениях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках ГЗ 0108-2019-0002 и поддержана РФФИ 19-04-00628.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность Ю.А. Краус за ценные советы и редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я.* Околочасовые сигналы, метаболизм, функции. Прямые межклеточные взаимодействия / Отв. ред. Васильев А.В. М.: Научный мир, 2021. 368 с. ISBN: 978-5-91522-505-2.
- Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А.* Пострефлекторная нейробиология поведения. М.: Издательский дом ЯСК, 2019. 589 с. (Разумное поведение и язык). После­словие проф. А.Г. Асмолова. ISBN 978-5 907117-52-5.
- Крушинский А.Л.* Плата за решение задачи: биофизические предпосылки и возможные эволюционные последствия // Российский журн. когнитивной науки. 2015. Т. 2. № 1. С. 52–61.
- Сахаров Д.А.* Генеалогия нейронов. М.: Наука, 1974. 184 с.
- Bayramov A.V., Ermakova G.V., Kuchryavyy A.V. et al.* Genome duplications as the basis of vertebrates' evolutionary success // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. P. 141–163. <https://doi.org/10.1134/S1062360421030024>
- Brodsky V.Y.* Direct cell-cell communications and social behavior of cells in mammals, protists, and bacteria. Possible causes of multicellularity // Russ. J. Dev. Biol. 2009. V. 40. P. 69–82. <https://doi.org/10.1134/S1062360409020027>
- Brunet C., Sprecher S.G.* Single-cell transcriptomic reveals dual and multi-transmitter use in neurons across metazoans // Front. Mol. Neurosci. 2021. 14:623148. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.623148>
- Buznikov G.A.* Preneuronal transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem // Russ. J. Dev. Biol. 2007. V. 38. P. 213–220. <https://doi.org/10.1134/S1062360407040042>
- D'iaconova T.L., D'iaconova V.E.* Participation of receptors of the NMDA type in regulation by glutamate of alimentary motor program of the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 2010. V. 46. № 1. P. 45–51.

- Dyakonova T.L.* Rearrangement of neuronal interactions upon activation of different glutamate receptors // *Dokl. Biol. Sci.* 2003. V. 388. P. 21–27.
<https://doi.org/10.1023/a:1022435607789>
- Dyakonova V.E.* Neuronal counter of the life span: does it exist? // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 197–200.
<https://doi.org/10.1134/S1062360420030066>
- Evrony G.D., Cai X., Lee E. et al.* Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain // *Cell.* 2012. V. 151. № 3. P. 483–496.
- Fiddes I.T., Lodewijk G.A., Mooring M., Bosworth C.M., Ewing A.D. et al.* Human-specific NOTCH2NL genes affect notch signaling and cortical neurogenesis // *Cell.* 2018. V. 173. № 6. P. 1356–1369.e22.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.051>
- Girskis K.M., Stergachis A.B., DeGennaro E.M., Doan R.N., Qian X. et al.* Rewiring of human neurodevelopmental gene regulatory programs by human accelerated regions // *Neuron.* 2021. S0896-6273(21)00580-8.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.005>
- Grassi D., Franz H., Vezzali R. et al.* Neuronal activity, TGF β -signaling and unpredictable chronic stress modulate transcription of Gadd45 family members and DNA methylation in the hippocampus // *Cereb. Cortex.* 2017. V. 27. № 8. P. 4166–4181.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhx095>
- Hazen J.L., Faust G.G., Rodriguez A.R. et al.* The complete genome sequences, unique mutational spectra, and developmental potency of adult neurons revealed by cloning // *Neuron.* 2016. V. 89. № 6. P. 1223–1236.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.004>
- Jékely G.* The chemical brain hypothesis for the origin of nervous systems // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2021. 376: 20190761.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0761>
- Moroz L.L.* Multiple origins of neurons from secretory cells // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. 9:669087.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.669087>
- Moroz L.L., Nikitin M.A., Poliřar P.G., Kohn A.B., Romanova D.Y.* Evolution of glutamatergic signaling and synapses // *Neuropharmacology.* 2021. 108740.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108740>
- Moroz L.L., Romanova D.Y., Kohn A.B.* Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2021. V. 376. № 1821:20190762.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0762>
- Moroz L.L., Romanova D.Y.* Selective advantages of synapses in evolution // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.726563>
- Nezlin L.P., Voronezhskaya E.E.* Early peripheral sensory neurons in the development of trochozoan animals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2017. V. 48. P. 130–143.
<https://doi.org/10.1134/S1062360417020060>
- Romanova D.Y., Heyland A., Sohn D., Kohn A.B., Fasshauer D., Varoqueaux F., Moroz L.L.* Glycine as a signaling molecule and chemoattractant in Trichoplax (Placozoa): insights into the early evolution of neurotransmitters // *Neuroreport.* 2020. V. 31. № 6. P. 490–497.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001436>
- Romanova D.Y., Varoqueaux F., Daraspe J., Nikitin M.A., Eitel M., Fasshauer D., Moroz L.L.* Hidden cell diversity in Placozoa: ultrastructural insights from *Hoilungia hongkongensis* // *Cell Tissue Res.* 2021. Epub ahead of print. PMID: 33876313.
<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03459-y>
- Rosenegger D., Lukowiak K.* The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea* // *Mol. Brain.* 2010. V. 3.
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-24>
- Ryan J.F., Pang K., Schnitzler C.E., Nguyen A.D. et al.* The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution // *Science.* 2013. V. 342. 6164:1242592.
<https://doi.org/10.1126/science.1242592>
- Sakharov D.A.* Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // *J. Neural. Transm.* 1974. Suppl. 11. P. 43–59.
- Shibata M., Pattabiraman K., Lorente-Galdos B. et al.* Regulation of prefrontal patterning and connectivity by retinoic acid // *Nature.* 2021.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03953-x>
- Shibata M. et al.* Hominini-specific regulation of CBLN2 increases prefrontal spinogenesis // *Nature.* 2021.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03952-y>
- Sukhinich K.K., Shakirova K.M., Dashinimaev E.B. et al.* Development of 3D cerebral aggregates in the brain ventricles of adult mice // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. P. 164–175.
<https://doi.org/10.1134/S1062360421030061>
- Sultan F.A., Sweatt J.D.* The role of the gadd45 family in the nervous system: a focus on neurodevelopment, neuronal injury, and cognitive neuroepigenetics // *Gadd45. Stress Sensor Genes* / Eds. Liebermann D.A., Hoffman B. Springer. 2013. P. 81–121.
- Wu W., Hill S.E., Nathan W.J. et al.* Neuronal enhancers are hotspots for DNA single-strand break repair // *Nature.* 2021. V. 593. P. 440–444.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03468-5>
- Xing L., Kalebic N., Namba T., Vaid S., Wimberger P., Hutter W.B.* Serotonin receptor 2A activation promotes evolutionarily relevant basal progenitor proliferation in the developing *Neocortex* // *Neuron.* 2020. S0896-6273(20)30758-3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.034>
- Zullo J.M., Drake D., Aron L. et al.* Regulation of lifespan by neural excitation and REST // *Nature.* 2019. V. 574. № 7778. P. 359–364.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1647-8>

Origin and Evolution of Nervous System: New Data from Comparative Whole-Genome Studies of Metazoa

V. E. Dyakonova*

*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia *e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

In the very recent years, comparative studies, based on genome and transcriptome sequencing techniques, have made great advances in evolutionary neuroscience. Several intriguing questions were addressed in these investigations with combination of field observations, laboratory experiments and genomics approaches. How and when could the first neurons have appeared in animal evolution? What could the first nervous systems of basal metazoans look like, and what could have been adopted by the modern vertebrate brain from an ancient organization? Why has glutamate become a neurotransmitter, and why does glutamate excitatory signalization dominate in the mammalian brain now? How often does co-transmission occur in the neurons of different metazoans? What are the genes that make us human and control development of the human brain? This review considers recent insights in evolutionary neurobiology, which are associated with comparative whole-genome and whole-transcriptome sequences studies on a large evolutionary scale.

Keywords: origin of neurons, neurotransmitters, glutamate, cotransmission, evolution of the nervous system, somatic mutations of the neuron genome, glutamate receptors