

**Российская академия наук**

**Журнал биологии развития**

# **ОНТОГЕНЕЗ**

**Том 53 № 2 2022 МАРТ—АПРЕЛЬ**

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 «Тематическая редакция»**

Оригинал-макет подготовлен ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

---

© Российская академия наук, 2022

© Редакция журнала “Онтогенез”  
(составитель), 2022

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
ПИ № ФС77-80515 от 23 марта 2021 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере  
связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

Подписано к печати 01.12.2019 г.      Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>      Уч.-изд. л. 9.75      Усл. печ. л. 9.53      Уч.-изд. л. 20.25  
Тираж 24 экз.      Зак. 2811      Бесплатно

---

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 «Тематическая редакция»,  
125252, г. Москва, ул. Зорге, д. 19, этаж 3, помещ. VI, ком. 44  
Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),  
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 53, номер 2, 2022

---

---

## ОБЗОРЫ

Эволюционная и индивидуальная пластичность консервативных сигнальных путей в развитии животных

*С. В. Кремнёв*

77

---

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

Отклонения в строении эфир при химической индукции стробилиации у *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria)

*П. С. Мостовщикова, Д. М. Саидов, И. А. Косевич*

94

Состав и содержание жирных кислот в биомассе молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) в условиях аквакультурного выращивания

*А. Е. Рудченко, Л. А. Меньшикова*

112

Ранние этапы эволюции мезодермы животных

*Н. Д. Озернюк, В. В. Исаева*

121

Повышение уровня внутриклеточного серотонина в бластомерах приводит к нарушениям паттерна спирального дробления у моллюска *Lymnaea stagnalis*

*А. И. Богомолов, Е. Е. Воронежская*

129

---

## МОРФОГЕНЕЗ

Разработка методики контролируемой деформации эмбриональных тканей для исследования механозависимых движений клеток

*Д. В. Бредов, Н. Н. Лучинская, И. В. Володяев*

136

---

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Влияние инактивации транскрипции тандемно повторяющейся перичентромерной ДНК на формирование безмембранных структур в созревающих ооцитах человека

*М. А. Добрынин, Н. М. Корчагина, Н. В. Пономарцев,  
О. И. Подгорная, Н. И. Енукашвили*

144

---

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Влияние ингибитора гистоновой деацетилазы HDAC (белиностата) на экспрессию арил-гидрокарбонowego рецептора и его генов-мишеней в культурах клеток человека

*А. А. Акишина, Р. О. Черезов, Ю. Е. Воронцова, О. Б. Симонова*

151

Исследование специфической локализации белка TOOTHBRIN из родственного семейства D4 у *Drosophila melanogaster*

*Е. Е. Куваева, Д. А. Куликова, О. Б. Симонова, И. Б. Мерцалов*

155

---

---

# Contents

---

---

Vol. 53, No. 2, 2022

---

---

## REVIEWS

Evolutionary and Ontogenetic Plasticity of Conserved Signaling Pathways  
in Animals' Development

*S. V. Kremnev*

77

---

## BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

Morphological Deviations in Ephyra after Chemical Induction of Strobilation  
in *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria)

*P. S. Mostovshikova, D. M. Saidov, and I. A. Kosevich*

94

Composition and Content of Fatty Acids in the Biomass of Juveniles Siberian Sturgeon  
(*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) in Aquaculture Conditions

*A. E. Rudchenko and L. A. Menshikova*

112

Early Stages of Animal Mesoderm Evolution

*N. D. Ozernyuk and V. V. Isaeva*

121

Increased Intracellular Serotonin Level within Blastomeres Leads to Disruption  
in the Spiral Cleavage Pattern in the Mollusc *Lymnaea stagnalis*

*A. I. Bogomolov and E. E. Voronezhskaya*

129

---

## MORPHOGENESIS

Establishment a Method for Controllable Deformatio of Embryonic Tissues  
to Study Mechanodependent Cell Movements

*D. V. Bredov, N. N. Luchinskaya, and I. V. Volodyaev*

136

---

## MOLECULAR BIOLOGY OF DEVELOPMENT

Influence of Inactivation of Tandemly Repeated Pericentromeric DNA Transcription  
on the Formation of Membraneless Structures at the End of Oocyte Maturation

*M. A. Dobrynin, N. M. Korchagina, N. V. Ponomartsev,  
O. I. Podgornaya, and N. I. Erukashvily*

144

---

## BRIEF COMMUNICATIONS

Effect of the Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor – Belinostat – on the Expression  
of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Target Genes in Human Cell Cultures

*A. A. Akishina, R. O. Cherezov, J. E. Vorontsova, and O. B. Simonova*

151

Studying the Specific Localization of TOOTHTRIN Protein from Related D4 Family  
in *Drosophila melanogaster*

*E. E. Kuvaeva, D. A. Kulikova, O. B. Simonova, and I. B. Mertsalov*

155

---

---

УДК 591.3

## ЭВОЛЮЦИОННАЯ И ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. С. В. Кремнёв<sup>a, b, \*</sup><sup>a</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119923 Россия<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: s.kremnyov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2021 г.

После доработки 06.12.2021 г.

Принята к публикации 10.12.2021 г.

В эволюционной биологии развития (EvoDevo) господствует представление о том, что сигнальные каскады, участвующие в регуляции ключевых процессов развития (становление осей тела, спецификация зародышевых листков, эмбриональная индукция), высоко консервативны. В то же время, имеются данные о том, что сигнальные пути, участвующие в регуляции процессов развития, крайне пластичны. В данном обзоре мы рассматриваем эволюционную и индивидуальную пластичность сигнальных каскадов, регулирующих некоторые онтогенетические процессы. Исследования пластичности молекулярных механизмов регуляции онтогенеза необходимы для понимания основных закономерностей эволюции животных, а также для внедрения и совершенствования прикладных биомедицинских технологий. Наш обзор позволит читателям с разных сторон взглянуть на концепцию “консервативности” молекулярных механизмов регуляции развития животных в онтогенезе и в эволюции.

**Ключевые слова:** пластичность развития, план строения, генные регуляторные сети, сигнальные каскады, EvoDevo

DOI: 10.31857/S0475145022020112

### ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная разметка основных осей тела во время развития животных является основой для всех последующих событий, включая дифференцировку клеток, образование тканей и органов, а также правильное функционирование всех систем взрослого организма. Удивительным является тот факт, что животные с разным планом строения используют в ходе развития один и тот же инструментальный сигнальных каскадов. Каким образом Metazoa “научились” регулировать работу эволюционно консервативных сигнальных путей при формировании разных планов строения? Сравнительное изучение закономерностей молекулярной разметки плана строения у представителей разных таксонов Metazoa может пролить свет на поставленный вопрос (Willmore, 2012; Ereskovsky et al., 2013).

В ходе исследований в области эволюционной биологии развития (EvoDevo) было обнаружено, что большинство животных, находящихся далеко друг от друга на эволюционном древе, имеют общие семейства генов, регулирующие разметку плана строения в ходе эмбрионального развития. К таким генам относятся лиганды канонического Wnt каскада, вовлеченные у билатерий в спецификацию передне-задней оси, а у книдарий – в

становление орально-аборальной оси (Petersen, Reddien, 2009). Также было показано наличие у книдарий генов-компонентов BMP-Chordin регуляторного молекулярного контура. Оказалось, что эти гены не только являются ортологами генов позвоночных. Их продукты у книдарий и позвоночных выполняют схожие функции: они вовлечены в становление второй оси тела, дорзо-вентральной у позвоночных и направительной у книдарий из класса Anthozoa (Bier, De Robertis, 2015; Genikhovich, Technau, 2017). В то же время, выявлены случаи, когда паттерны экспрессии гомологичных генов заметно различаются даже у представителей близких таксонов. Ярким примером этого являются различия в молекулярных механизмах определения осей конечности у разных тетрапод (Christen, Slack, 1998).

В недавнем прошлом большая часть усилий исследователей, работающих в области EvoDevo, была направлена на поиск таксон-специфических генов, которые были бы ответственны за возникновение таксон-специфических эволюционных новшеств. Однако, мнение о том, что новые таксоны животных возникали благодаря появлению новых генов, подвергается сомнению (Peterson, Davidson, 2000; Levine, Tjian, 2003). Появилось большое количество свидетельств того, что эволюция плана строения и молекулярная

разметка зачатков отдельных органов основаны на пластичности генных регуляторных сетей и “внедрении” новых контуров регуляции активности уже имеющихся генов и сигнальных путей. Такие эволюционные изменения могут быть более значимыми, чем появление новых генов или изменение функций белков (Carroll, 2000; Levine, Tjian, 2003; Kherdjemil et al., 2016; Cary, Hinman, 2017; Seki et al., 2017; Genikhovich, 2019).

### ЭВОЛЮЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ BMP-CHORDIN МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНТУРА ПРИ СТАНОВЛЕНИИ ВТОРОЙ ОСИ ТЕЛА

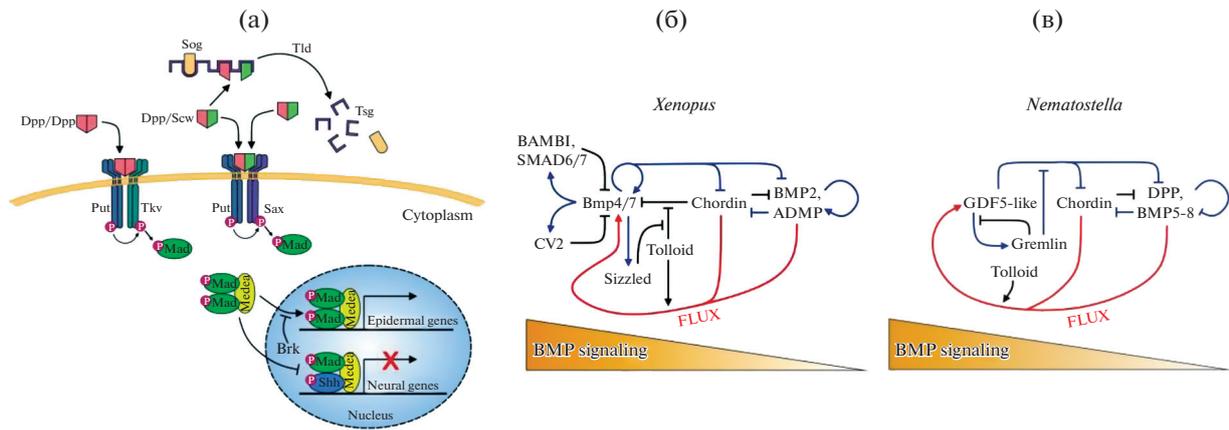
Как в эволюции появилось огромное разнообразие таксонов Metazoa — один из фундаментальных вопросов биологии. Появление билатеральности у животных было важным эволюционным переходом, который мог послужить предпосылкой диверсификации планов строения (Genikhovich, Technau, 2017). Все животные, кроме четырех типов (Porifera, Stenophora, Placozoa и Cnidaria) составляют кладу, отличительной чертой которых является двусторонняя симметрия тела. Билатеральная симметрия достигается за счет пересечения двух ортогональных осей тела: передне-задней (А-Р) и дорзально-вентральной (D-V). Система координат, задаваемая молекулярной разметкой тела эмбриона вдоль этих осей, а также расстоянием от средней линии тела, позволяет точно контролировать формирование плана строения, в том числе взаимное расположение отдельных структур и органов.

Среди базальных групп Metazoa, тип Cnidaria уникален тем, что он включает животных как с двусторонней, так и радиальной симметрией. Представители подтипа Medusozoa, состоящего из классов Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa и Staurozoa, обладают радиальной симметрией и единственной орально-аборальной (О-А) осью тела. В то же время представители класса Anthozoa имеют вторую (направительную) ось, ориентированную вдоль щелевидной глотки. Билатеральность плана строения Anthozoa также проявляется в расположении продольных септ (мезентериев) гастральной полости. Становление дорзо-вентральной оси у билатеральных животных и направительной оси у Anthozoa регулируется молекулярным контуром BMP-Chordin. Так как книдарии являются сестринской группой билатерий, возникает вопрос, функционировал ли регуляторный контур BMP-Chordin уже у общего предка книдарий и билатерий или такой способ установления билатеральности тела появился независимо в эволюции Anthozoa и Bilateria (Genikhovich, Technau, 2017).

Рассмотрим особенности работы сигнального каскада BMP при становлении оси тела. Ключевым моментом для понимания механизмов разметки тела билатерий вдоль D-V оси стала идентификация гомологичных белков Short gastrulation (Sog) у дрозофилы и Chordin у шпорцевой

лягушки. Функцией данных белков оказалась инактивация BMP лигандов, предотвращающая их взаимодействие с рецепторами. Крайне важной особенностью этих BMP-связывающих белков, которая отличает их от других антагонистов BMP (Gremlin или Noggin), является способность комплексов BMP-Chordin и BMP-Sog к диффузии на большие расстояния. Однако такой комплекс может быть разрушен металлопротеазой Tolloid, в результате чего высвобождается лиганд BMP. Если расщепление комплекса происходит рядом с источником Chordin (или Sog), то высвобождаемый BMP опять будет связан. Однако если расщепление происходит на расстоянии от источника Chordin (или Sog), то лиганд BMP может связаться со своим рецептором прежде, чем будет инактивирован. Таким образом, Chordin у шпорцевой лягушки и Sog у дрозофилы ингибируют BMP сигнальный каскад в области своей экспрессии, но активируют его на расстоянии. Работа белков Chordin (или Sog) по созданию максимума сигнала BMP в области, удаленной от источника Chordin (Sog), получила название “челночной функции” (“shuttling”) (Wang, Ferguson, 2005; Shilo et al., 2013; Bier, De Robertis, 2015).

В данном разделе мы рассматриваем разнообразие роли BMP сигнального каскада в становлении D-V оси у беспозвоночных животных. Поэтому мы сосредоточимся на описании разметки D-V оси у дрозофилы, а не у другого модельного объекта — амфибии *Xenopus laevis*. У дрозофилы вентро-дорзальная разметка тела инициируется материнским морфогеном Dorsal (Dl). На вентральной стороне эмбриона, в самой высокой точке своей концентрации, Dl индуцирует спецификацию мезодермы. Нейроэктодерма дифференцируется при средней концентрации Dl, а эмбриональный эпидермис — при самой низкой концентрации Dl. При отсутствии Dl на дорзальной стороне эмбриона формируются внезародышевые ткани. Dl транспортируется в ядра на вентральной стороне эмбриона под действием Toll сигнального каскада. Гены “первичного ответа” на Dl в дорзальной и латеральной областях эмбриона активируют гены, участвующие в создании градиента BMP. Внутриклеточная часть BMP сигнального каскада дрозофилы аналогична таковой у позвоночных. Компонентами этого сигнального каскада у дрозофилы являются два рецептора BMP типа I и один рецептор BMP типа II, продукт гена *Punt*. Внутри клетки, к нижестоящим генам-мишеням, сигнал передается фосфорилированными молекулами Mad (ортолог белка SMAD1/5 позвоночных) и Medea (ортолог белка SMAD4 позвоночных). Важно отметить, что в отличие от позвоночных, в процессе формирования D-V оси у дрозофилы участвуют только два лиганда BMP. Это упомянутый выше Dpp (ортолог BMP2/4), экспрессирующийся на дорзальной стороне, и Screw (ортолог BMP5-8), равномерно экспрессирующийся по всему эмбриону (рис. 1а). У



**Рис. 1.** (а) Схема BMP сигнального каскада у дрозофилы (по Bier, De Robertis, 2015). Пояснения в тексте. (б, в) Молекулярные контуры BMP-Chordin у шпорцевой лягушки *Xenopus* и книдарии *Nematostella* соответственно. Синими линиями отмечены регуляции на транскрипционном уровне, черными линиями отмечены белок-белковые взаимодействия, красной линией отмечена функция переносчика Chordin (по Genikhovich et al., 2015).

дрозофилы Sog (ортолог белка Chordin) – единственный секретлируемый антагонист BMP каскада. Надо отметить, что BMP регуляторный контур шпорцевой лягушки имеет более сложную структуру, хотя и содержит такой же центральный модуль Chordin-BMP, как у дрозофилы. Chordin-BMP система шпорцевой лягушки включает в себя четыре типа лигандов BMP. Два из них экспрессируются вентрально (BMP4 и BMP7), а два – дорзально (BMP2 и ADMP) (Bier, De Robertis, 2015) (рис. 1б).

Регуляторный контур Chordin-BMP не является уникальным признаком Bilateria. Такой вывод можно сделать на основе анализа доступных геномных и транскриптомных баз данных. Дело в том, что ортологи Chordin, BMP2/4 и BMP5-8, а также все внутриклеточные компоненты сигнального пути BMP присутствуют у всех изученных видов двусторонне-симметричных книдарий (класс Anthozoa). Регуляция становления второй (направительной) оси у них зависит от активности сигнального каскада BMP, точно так же как у билатерий, (Hayward et al., 2002; Finnerty et al., 2004; Rentzsch et al., 2006; Saina et al., 2009; Genikhovich et al., 2015). К сожалению, единственной моделью, доступной для изучения становления взаимно перпендикулярных осей тела у книдарий, является *Nematostella vectensis*. У *Nematostella*, в отличие от дрозофилы и шпорцевой лягушки, BMP4 и Chordin сначала формируют радиально симметричный паттерн экспрессии (Rentzsch et al., 2006). Однако челночная функция Chordin способствует становлению направительной оси тела, на каждом из полюсов которой формируются два сигнальных центра со своим собственным набором лигандов и антагонистов каскада BMP. BMP4 и BMP5-8 экспрессируются вместе с Chordin на одной стороне эмбриона, а GDF5-подобный белок вместе с Gremlin экспрессируется на противоположной стороне (Saina, et al., 2009; Genikhovich

et al., 2015) (рис. 1в). Как и у билатерий, эти секретлируемые факторы организуют регуляторный молекулярный контур, участвующий в формировании градиента активности BMP каскада вдоль направительной оси. Функциональные эксперименты на эмбрионах *Nematostella* четко указывают на то, что Chordin перемещает лиганды BMP из областей, экспрессирующих Chordin, на противоположную сторону эмбриона, где формируется максимум активности BMP каскада (Genikhovich et al., 2015). Экспериментальное подавление передачи сигналов BMP у *Nematostella* приводит к нарушению формирования направительной оси и радиализации тела на молекулярном и морфологическом уровне. Важно отметить, что радиализация тела может быть достигнута не только с помощью нокаута любого из двух ключевых генов лигандов BMP (BMP4 и BMP5-8). К такому же результату приводит нокаут Chordin, который предотвращает челночный перенос лигандов BMP (Genikhovich et al., 2015). Однако до сих пор остается неясно, появились ли молекулярные контуры BMP-Chordin, связанные со становлением второй оси тела, но различающиеся структурой, независимо у билатерий и книдарий. Можно предположить, что две оси тела имел уже их общий предок, а структура молекулярных контуров BMP-Chordin дивергировала позднее, в ходе независимой эволюции этих групп. Для прояснения этого вопроса необходимо выяснить как эволюционировал план строения радиально-симметричных представителей книдарий из группы Medusozoa, а также какова роль BMP каскада в определении главных осей тела у Medusozoa (Genikhovich, Technau, 2017).

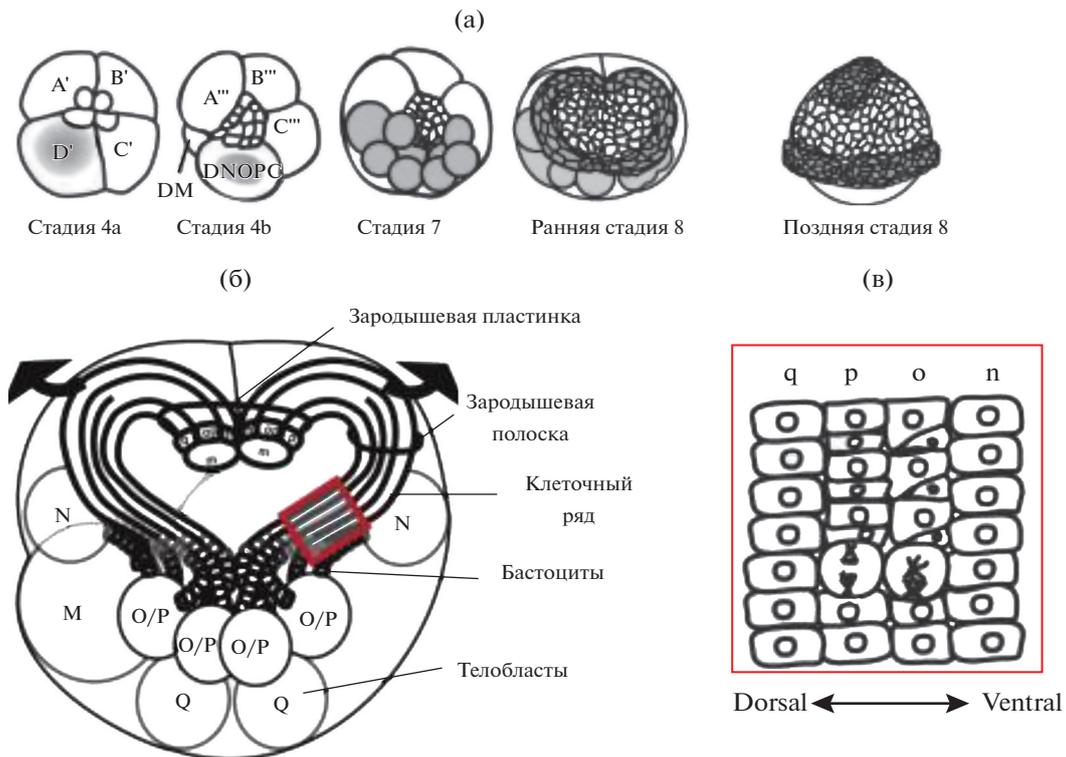
Книдарии из группы Medusozoa (классы Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Staurozoa) имеют радиально симметричный план строения и только одну – орально-аборальную (О-А) – ось тела. К настоящему времени доступны несколько тран-

скриптомов и два генома представителей Medusozoa (*Hydra* и *Clytia*) (Chapman et al., 2010; Leclère et al., 2019). Их анализ указывает на наличие у Medusozoa лигандов BMP, секретируемых антагонистов BMP, протеаз Tolloid, рецепторов BMP и всех внутриклеточных компонентов каскада BMP. Однако мы пока не знаем, какие функции выполняет каскад BMP в развитии этой группы кишечнополостных. Более того, мы очень мало знаем о том, каков паттерн активности BMP каскада в развитии эмбриона и у взрослых Medusozoa. У взрослых полипов *Hydra* и *Clytia* *BMP5-8* экспрессируется в области формирования шупалец (Reinhardt et al., 2004; Kraus et al., 2015), кроме того, у гидры *BMP5-8* экспрессируется в области почкования и регенерации орального конца (Reinhardt et al., 2004). *BMP2/4* также был идентифицирован у *Hydra* (Watanabe et al., 2004), *Podocoryne* (Reber-Muller et al., 2006) и *Clytia* (Leclère et al., 2019). Однако детальный филогенетический анализ ставит под сомнение тот факт, что *BMP2/4* гидроидов является настоящим ортологом *BMP2/4* Anthozoa (Genikhovich, Technau, 2017). Любопытно, что только у гидры был найден Chordin-подобный белок (HyChdl). Однако у HyChdl отсутствует (возможно, был потерян) N-концевой участок молекулы с цистеин богатым доменом, который присутствует у белков Chordin других животных. Кроме того, у HyChdl присутствует дополнительный домен связывания инсулинподобного фактора роста (IGFBP) и фоллистатинновый домен (Rentzsch et al., 2007). Оверэкспрессия *HyChdl* приводит к дорсализации эмбрионов костистой рыбы *Danio rerio*, а это значит, что *HyChdl* обладает свойствами антагониста BMP сигнального каскада. Однако филогенетический анализ белков Chordin показал, что Chordin *Nematostella* группируется с белками Chordin/Sog билатерально-симметричных животных, в то время как HyChdl формирует сестринскую группу к ним и другим Chordin-подобным молекулам билатерий (Genikhovich, Technau, 2017). Ортологи Chordin не были обнаружены и в геноме гидроида *Clytia* (Leclère et al., 2019). Среди представителей Scyphozoa, настоящий Chordin был идентифицирован в транскриптом *Aurelia* (Genikhovich, Technau, 2017; Brekhman et al., 2015). Однако, в отличие от гидроидных, у *Aurelia* в ходе эволюции был утерян *BMP2/4* (Kraus et al., 2015).

Суммируя эмпирические данные и данные компьютерного моделирования (Gaikovich et al., 2015), можно предположить, что функциональная активность молекулярного контура Chordin-BMP является ключевой для появления в эволюции второй оси тела. Тогда потеря одного из компонентов данного молекулярного контура могла привести к потере билатерального плана строения, что мы и наблюдаем у кишечнополостных из группы Medusozoa (Genikhovich, Technau, 2017). Однако не все так очевидно. Встречаются представители билатерально симметричных животных, которые в ходе эволюции потеряли один из компонентов

Chordin-BMP каскада, но сохранили билатеральный план строения.

Например, в геноме пиявки *Helobdella* был утерян *Chordin*, центральный участник Chordin-BMP молекулярного контура. Однако пиявки обладают некоторыми уникальными особенностями развития. Важную роль в их эмбриогенезе играет упорядоченное расположение клеточных клонов. Сегментарная эктодерма и мезодерма формируются из зоны роста, расположенной на заднем конце тела. Зона роста состоит из пяти пар стволовых клеток (телобласты M, N, O/P, O/P и Q). Каждый телобласт многократно и асимметрично делится, давая начало ряду клеток-основателей (первичные бластоциты). В дорзо-постериорной области эмбриона латеральные ряды клеток начинают формировать левую и правую зародышевую полоски (рис. 2). По мере того, как телобласты продолжают добавлять бластоциты с заднего конца, зародышевые полоски смещаются в вентро-вегетативном направлении, объединяясь вдоль будущей вентральной средней линии и формируя зародышевую пластинку. Сегментарная эктодерма формируется из четырех эктодермальных клонов (N, O, P, и Q) (Weisblat, Shankland, 1985). Четыре эктодермальных ряда клеток (обозначены буквами q, p, o и n соответственно) располагаются друг за другом вдоль D-V оси каждой зародышевой полоски в соответствии с их проспективным значением (Weisblat et al., 1984) (рис. 2в). Несмотря на общую детерминированность развития *Helobdella*, имеются экспериментальные данные о том, что именно контакт с самым дорсальным рядом клеток q определяет судьбу соседних бластоцитов, возникающих из стволовых клеток O/P (Huang, Weisblat, 1996; Kuo, Shankland, 2004). Авторы одной из работ предположили, что по аналогии с формированием D-V разметки тела у других первичноротых животных, BMP каскад может участвовать в этом процессе и у *Helobdella*, а источники сигнала в данном случае — клетки-производные телобласта Q (Kuo, Weisblat, 2011). Авторы сначала исследовали паттерны экспрессии BMP лигандов и их антагонистов в ходе развития *Helobdella*. На стадиях, когда у *Helobdella* предположительно происходит разметка D-V оси экспрессируются четыре лиганда BMP (*Hau-admp*, *Hau-bmp2/4a*, *Hau-bmp2/4b*, *Hau-bmp5-8*) и один антагонист (*Hau-gremlin*). Ген *Chordin* отсутствует в геноме *Helobdella*. Исследование паттернов экспрессии идентифицированных компонентов BMP каскада с помощью гибридизации *in situ* показало, что *ADMP*, *BMP2/4a* и *BMP2/4b* экспрессируются равномерно вдоль обеих зародышевых полосок. Напротив, *BMP5-8* экспрессируется только в ряде q, самом дорсальном ряде клеток зародышевой полоски. Полученные результаты позволили предположить, что *BMP5-8* является основным лигандом, участвующим в D-V разметке сегментарной эктодермы пиявок, хотя у большинства других исследованных видов *BMP2/4* является центральным BMP



**Рис. 2.** Схема развития пиявки *Helobdella*. (а) Спецификация дорзо-вентральной оси происходит в результате сегрегации телоплазмы (серый цвет) в бластомерах квадранта D (стадии 1–6), а затем в пяти симметрично расположенных пар телобластов (стадия 7). Телобласты дают начало левой и правой зародышевым полоскам, покрытым эпителием, который в свою очередь формируется из микромеров (ранняя стадия 8). Впоследствии зародышевые полоски сливаются, формируя зародышевую пластинку (поздняя стадия 8). (б) Эмбрион на ранней стадии 8. Стрелки указывают на движения зародышевых полосок при формировании зародышевой пластинки. Красным прямоугольником выделена часть зародышевой полоски, показанной на (в) (из Куо, Weisblat, 2011, лицензия 5197760854830 от 28 ноября 2021 г.).

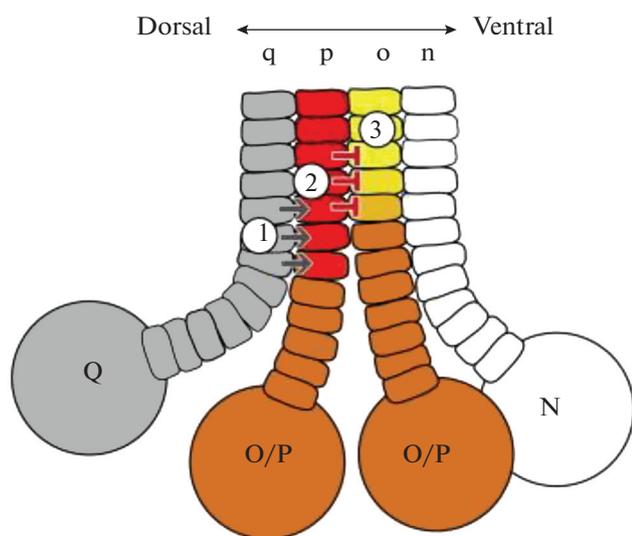
лигандом, участвующем в установлении D-V оси тела. Более того, и у позвоночных, и у плоских червей, *ADMP* и *BMP2/4* экспрессируются на одном из полюсов D-V оси тела. Полярная экспрессия этих генов поддерживается за счет авторегуляторной обратной связи (Reversade, De Robertis, 2005; Gavino, Reddien, 2011; Molina et al., 2011) (рис. 1б, 1в). Так как в зародышевых полосках *Hellobdella* паттерны экспрессии этих генов колокализированы, авторегуляторная обратная связь в развитии пиявок работать не может.

Неожиданным оказался факт, что *Gremlin* на высоком уровне специфически экспрессируется в ряду клеток p, а не в вентральных клетках зародышевой полоски. Ряд p является соседом дорзального ряда q и плотно к нему прилегает (рис. 2в). Надо отметить, до этой работы не были известны примеры участия *Gremlin* в определении D-V оси у других животных.

На основе экспериментальных данных авторы предложили следующую модель D-V разметки зародышевых полосок у *Hellobdella* (рис. 3) (Куо, Weisblat, 2011). Экспрессия *BMP5-8* в дорзальном ряду клеток q приводит к активации BMP сигнального каскада в соседнем ряду p. Активация каскада BMP приводит к активации экспрессии

BMP антагониста *Gremlin* в клетках ряда p. В свою очередь, *Gremlin*, за счет связывания *BMP2/4*, понижает активность BMP каскада в клетках ряда o. Активность BMP каскада в клетках ряда p, несмотря на экспрессию в них *Gremlin*, все равно остается высокой, так как *Gremlin* специфично инактивирует только *BMP2/4*, но не *BMP5-8*. Такая последовательность событий приводит к дифференцировке клеток рядов p и o. Например, в клетках ряда p этот процесс приводит к запуску экспрессии *Six1/2a*, а в клетках ряда o – *Pax6a*. Интересно отметить, что в данной системе антагонист BMP, *Gremlin*, способен инактивировать специфический лиганд BMP. В то же время, *Chordin*, антагонист BMP, участвующий в разметке D-V оси большинства изученных животных, не имеет специфичности, и способен инактивировать все лиганды BMP (Gline et al., 2009). Таким образом, специфичность взаимодействий лиганд-антагонист является ключевой для формирования D-V разметки сегментарной эктодермы пиявки.

Остается нерешенным вопрос, что именно привело к перестройке молекулярного контура BMP-Chordin у пиявок. Скорее всего, молекулярный каскад BMP в данном случае подстраивался в ходе эволюции к изменениям эмбрионального



**Рис. 3.** Схема спецификации дорзо-вентральной оси зародышевой полоски у пиявки *Helobdella*. (1) Близкодействующее взаимодействие клеточного ряда q на клеточный ряд p опосредованное BMP5–8; (2) BMP5–8 запускает спецификацию клеток ряда p (красный), включая повышение экспрессии *Gremlin*; (3) активность *Gremlin* определяет судьбу клеток в ряду o (yellow) путем ингибирования BMP2/4 (из Kuo, Weisblat, 2011, лицензия 5197760854830 от 28 ноября 2021 г.).

развития и пространственного расположения эмбриональных зачатков. В какой-то момент топология эмбриональных зачатков у пиявок изменилась настолько, что механизмы разметки с помощью дальнедействующих взаимодействий стали утрачивать эффективность. Это сделало возможной потерю ключевых компонентов сигнального каскада, обеспечивающего такие взаимодействия. В данном случае это произошло с *Chordin*. Таким образом, мы можем наблюдать эволюционные изменения в архитектуре молекулярного контура в ответ на изменение морфогенезов эмбрионального развития. Радикальная перестройка каскада BMP-Chordin у пиявок не привела к потере признака, определяющего план строения данной группы – билатеральности.

Надо отметить, что потеря BMP-Chordin регуляторного контура характерна не для всех представителей Lophotrochozoa: компоненты данного каскада были выявлены у моллюсков *Crassostrea gigas* (Tan et al., 2017) и *Lottia gigantea* (Kuo, Weisblat, 2011). У *C. gigas* была выявлена экспрессия ортолога BMP2/4 на дорзальной стороне, а *Chordin* на вентральной. Функциональных исследований работы данного сигнального каскада у представителей Lophotrochozoa проведено не было. Однако данных уже достаточно для того, чтобы отвергнуть гипотезу об уникальном механизме дорзовентральной разметки у Lophotrochozoa. Полученных данных также достаточно для поддержки гипотезы о том, что BMP2/4 и *Chordin* использовались для становления D-V оси тела у общего предка всех билатерий.

Более загадочным случаем является модификация BMP-Chordin контура у оси *Nasonia vitripennis*. Было показано, что *Nasonia* использует уникальный способ формирования и уточнения градиента BMP, который отличается от характерного для *Drosophila* (Özüak et al., 2014a). Отличительной чертой BMP регуляторного контура у *Nasonia* является отсутствие компонента *Sog* (ортолога *Chordin*). Ген *Sog* отсутствует в геноме *Nasonia* (Özüak et al., 2014b). Ортологи *Sog/Chordin* присутствуют в геномах большинства животных и важны для формирования градиентов BMP на различных стадиях развития организма. В настоящее время остается открытым вопрос о том, как у *Nasonia* динамика передачи сигналов BMP регулируется в отсутствие транспортной системы *Sog*. Для решения этого вопроса важна идентификация фактора, который необходим для первичного становления дорзовентральной асимметрии *Nasonia*. Напомним, что у *Drosophila* становление этой асимметрии обеспечивается фактором Toll, который регулирует экспрессию *Sog*, *Dpp* и *Tld*. Поскольку у *Nasonia* активность BMP каскада абсолютно не зависит от Toll, вероятно используется другой, еще не открытый, способ первоначального нарушения D-V симметрии. Таким образом, у *Nasonia* роль сигнальной системы BMP в регуляции становления дорзовентральной разметки тела кардинально отличается от той, которая характерна для других модельных объектов.

У пиявки движущим фактором модификации регуляторного контура BMP каскада стало изменение эмбрионального развития. Это не могло быть причиной эволюции молекулярных механизмов дорзовентральной разметки тела у *Nasonia*. *Nasonia* относится к группе насекомых, которые, как и *Drosophila*, имеют длинную зародышевую полосу. Топология эмбриональных зачатков, а также клеточные механизмы раннего развития *Nasonia* и *Drosophila* мало чем различаются.

В ходе недавних исследований была найдена еще одна группа насекомых, у которых отсутствует ген *Sog*. Это сверчки рода *Gryllus*. Никаких антагонистов BMP, которые могли бы выполнять роль, аналогичную роли *Sog*, на данный момент, у сверчков не найдено. Самым неожиданным является тот факт, что у сверчков, в отличие от *Nasonia*, фактор Toll участвует в активации BMP каскада. Данные результаты позволяют предположить, что у сверчков в дорзовентральной разметке тела все-таки может участвовать антагонист BMP, однако до сих пор его не смогли идентифицировать (Pechmann et al., 2021).

Интересно отметить, что у мышей, мутантных по гену *Chrd*, D-V ось устанавливается, если только эмбрион не погибает на ранних стадиях развития. Это может свидетельствовать о наличии “подстраховочных” механизмов, обеспечивающих функционирование BMP-Chordin регуляторного контура. Однако у выживших мышей генотипа *Chrd*–/– наблюдаются нарушения формирования глоточного

региона (Bachiller et al., 2003). Можно предположить, что система Chordin-ВМР является примером “глубокой гомологии” механизмов формирования глоточного региона: у книдарий из класса Anthozoa становление направительной оси определяет в первую очередь морфогенез глотки.

Разнообразие исследованных видов животных и полученные данные о структуре и функционировании регуляторного контура ВМР, участвующего у них в дорзовентральной разметке, указывают на наличие “подстраховочных” механизмов и/или альтернативных способах регуляции. Таким образом, потеря одного из компонентов данного регуляторного контура не обязательно приводит к утрате билатеральности.

Имеющиеся данные позволяют усомниться в том, что модификация ВМР сигнального каскада — первопричина перехода от радиального-симметричного плана строения к билатеральному (и обратно). Модификации ВМР каскада могут являться следствием давления естественного отбора, направленного на поддержание того или иного плана строения (например, радиального у Medusozoa). Некоторые авторы предполагают, что симметрия тела является адаптивным признаком (Hollo, 2017). Соответственно, устойчивое формирование адаптивного плана строения поддерживается отбором. Это означает, что в ходе эволюции отбираются те механизмы развития (морфогенезы, молекулярная разметка осей тела), которые позволяют стабильно формировать билатеральный план строения (или переходить к радиальному плану строения). Таким образом, отбор в ходе эволюции плана строения идет по морфологическим признакам, но не по отдельным генам, а пластичность генетического инструментария является предпосылкой, обеспечивающей устойчивое формирование признаков в развитии.

#### ЭВОЛЮЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ РАЗМЕТКИ НЕРВНОЙ ТРУБКИ ПОЗВОНОЧНЫХ: SHH СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

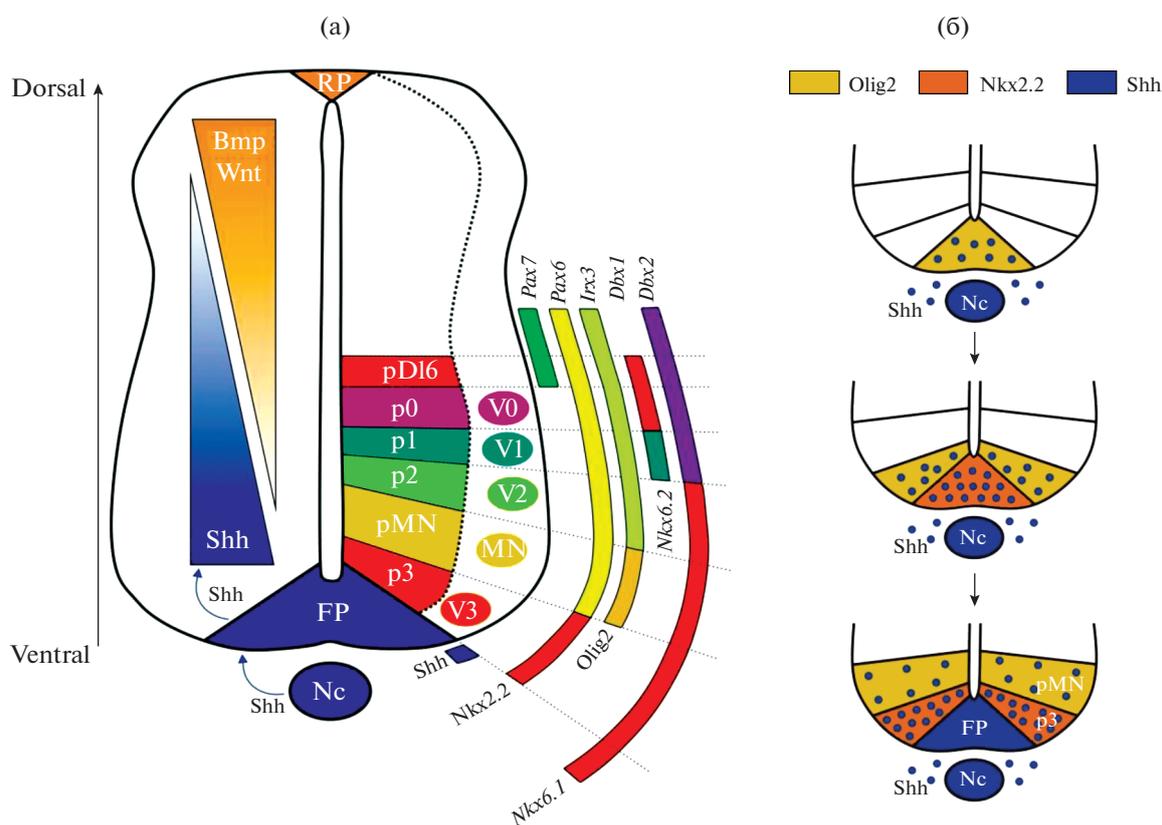
Для головного и спинного мозга позвоночных характерны региональные функциональные и структурные различия, проявляющиеся вдоль дорзовентральной оси тела. Эти различия формируются в развитии в результате уникальной комбинаторной экспрессии генов в клетках-предшественниках нервной трубки, что, в свою очередь, приводит к дифференцировке различных типов нейронов (Goulding et al., 2002). Предполагается, что паттерн экспрессии генов вдоль D-V оси нервной трубки позвоночных является результатом тонкой настройки работы сигнальных каскадов, связанной с градиентами секретируемых морфогенов (Briscoe, Blassberg, 2013). В центральной нервной системе морфоген Sonic Hedgehog (Shh) формирует вентро-дорзальный градиент и экспрессируется в клетках дна нервной пластинки

и хорде. Первичная разметка нервной трубки является классическим примером индукционного процесса в развитии животных. По общепринятым представлениям, хорда, расположенная под нервной трубкой, продуцирует Shh, который, в свою очередь, индуцирует производство Shh в клетках дна нервной трубки. Таким образом, устанавливается дорзовентральный градиент распределения этого морфогена с максимальной концентрацией в области его экспрессии. Данная классическая модель сформировалась на основе результатов экспериментов по пересадкам фрагментов уже сформированной хорды, в которых была выявлена ее способность индуцировать морфологическую дифференцировку дна нервной трубки (van Straaten et al., 1988; Smith, Schoenwolf, 1989). После открытия Shh (Riddle et al., 1993) и его индуцирующей способности (Echelard et al., 1993), сложилось представление о том, что именно хорда является индуктором дифференцировки дна нервной трубки, а индуцирующим агентом является Shh.

Если рассматривать события с точки зрения классической модели, градиент Shh индуцирует формирование дорзовентрального градиента активности транскрипционных факторов семейства Gli, которые вместе с Sox2 участвуют в дальнейшей разметке нервной трубки (Peterson et al., 2012). Морфогены Wnt и ВМР формируют противоположно направленный дорзовентральный градиент, экспрессируясь в крыше нервной трубки и покровной эктодерме (Liem et al., 1995; Megason, McMahon, 2002; Chizhikov, Millen, 2005) (рис. 4а).

Комбинация активности морфогенов и их мишеней (напр. *Pax7*, *Pax6*, *Nkx2.2*, *Olig2*, *Ddx1*, *Nkx6.2* и др.), приводят к высокоточной разметке нервной трубки на отдельные регионы вдоль дорзовентральной оси, в которых происходит спецификация определенных подтипов нейронов (Jessell, 2000). Ключевым морфогеном в данном процессе считается именно Shh. Выделяют шесть регионов-предшественников разных подтипов нейронов, расположенных вдоль дорзовентральной оси нервной трубки: дно нервной трубки (FP), pMN, p2, p1, и p0 домены (рис. 4а). Эти домены возникают последовательно в ходе развития нервной трубки в зависимости от накопления и распределения сигнала Shh (Jeong, McMahon, 2005), изначальным источником которого является хорда (рис. 4б).

Исследование индукционных свойств хорды и ее способности формировать молекулярную разметку соседних тканей является крайне важным для понимания основополагающих принципов эмбриональной индукции (Anderson, Stern, 2016) и развития нервной системы позвоночных. Однако универсальность роли хорды как организатора ставится под сомнение некоторыми авторами (Le Douarin, Halpern, 2000; Patten et al., 2003). Например, у особей *D. rerio*, мутантных по гену *no tail* (ортолог *brachyury*), нарушено развитие хорды, но дно нервной трубки развивается у них нормально



**Рис. 4.** Становление градиента Shh в вентральной части нервной трубки позвоночных определяет поэтапную активацию регуляторных транскрипционных факторов в прогениторных клетках нейронов разных типов. (а) Вдоль дорзо-вентральной оси вентральной части нервной трубки расположены шесть доменов прогениторных клеток FP, p3, pMN, p2, p1 и p0, из которых развиваются нейроны V0–V3 и MN. Пространственная организация прогениторных доменов в вентральной части нервной трубки устанавливается градиентом Shh, который секретируется хордой и дном нервной трубки. За разметку дорзальной части нервной трубки отвечают противонаправленный градиент BMP и Wnt. Каждый прогениторный домен экспрессирует уникальную комбинацию транскрипционных факторов *Nkx2.2*, *Olig2*, *Nkx6.1*, *Nkx6.2*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3*, *Pax6* и *Pax7*. (б) Транскрипционные факторы *Olig2* и *Nkx2.2*, а также сам Shh определяют три самых вентральных прогениторных домена (pMN, p3 и FP соответственно). Экспрессия каждого из этих маркеров запускается в последовательные моменты времени развития нервной трубки по средней линии. Экспрессия каждого маркера сдвигается в дорзальном направлении при активации экспрессии следующего маркера на средней линии. Данные события происходят вследствие накопления и расширения градиента морфогена Shh в вентральной части нервной трубки. Nc – хорда, FP – дно нервной пластинки, RP – крыша нервной трубки.

(Halpern, 1993). Точно так же, развитие дна нервной трубки не было нарушено у эмбрионов, у которых была механически удалена прогениторная область хорды (Shih, Fraser, 1996). Более того, на *D. rerio* было показано, что активность сигнального каскада Shh не существенна для индукции дифференцировки клеток дна нервной трубки, а эктопическая оверэкспрессия *Shh* не приводит к их эктопической дифференцировке (Schauerte et al., 1998). На эмбрионах *Xenopus* было показано, что у бесхвостых амфибий активность Shh слабо регулирует экспрессию генов дна нервной трубки, но при этом оказывает сильное влияние на экспрессию латеральных транскрипционных факторов, таких как *Nkx2.2* (Peyrot et al., 2011).

Наконец, пластичность механизмов индукции дифференцировки дна нервной трубки подтверждается в экспериментах на органоидах, полученных из эмбриональных стволовых клеток мыши.

Было показано, что обработка ретиноевой кислотой дорзализованных органоидов приводит к спонтанному нарушению симметрии органоида и формированию дорзовентрального паттерна экспрессии *Shh*, а также транскрипционных факторов, размечающих дно нервной трубки. Таким образом, продемонстрирована возможность автономной разметки нервной трубки в отсутствие внешних организаторов, в частности хорды (Ranga et al., 2016; Ishihara et al., 2017).

Несмотря на наличие противоречивых данных о хорде, как источнике сигнала, необходимого для дифференцировки дна нервной трубки, начальные стадии экспрессии *Shh* в развитии позвоночных до недавнего времени не были подробно исследованы. Данный пробел был заполнен в нашей работе (Kremnyov et al., 2018), посвященной сравнительному исследованию начальных этапов

экспрессии *Shh* в развитии трех позвоночных: кролика, курицы и шпорцевой лягушки.

Было показано, что паттерн экспрессии *Shh* в ходе развития кролика полностью согласуется с классическими взглядами на дорсовентральную разметку нервной трубки позвоночных. Сначала экспрессия *Shh* детектируется в хорде, а позже экспрессия *Shh* начинается в клетках дна нервной пластинки. Такая динамика экспрессии *Shh* дает основания предполагать, что в хорда выступает организатором, запускающим экспрессию *Shh* в дне нервной трубки.

Однако динамика экспрессии *Shh* в ходе развития цыпленка и кролика имеет существенные различия. У эмбрионов цыпленка на стадии 5 НН (таблица нормального развития; Hamburger, Hamilton, 1951), которые начинают формирование хорды, экспрессия *Shh* образует полосу вдоль срединной линии эмбриона, впереди от гензеновского узелка, а экспрессия в гензеновском узелке имеет лево-правую асимметрию (рис. 5а). При подробном исследовании паттернов экспрессии на срезах, было показано, что задние *Shh*-положительные ткани лежат непосредственно над *Shh*-негативной хордой (рис. 5б). В срединной области тела эмбриона осевая мезодерма, и нейроэктодерма *Shh*-позитивны. В передней области *Shh* экспрессируется только в прехордальной пластинке, а передняя нейроэктодерма остается негативной. Таким образом, формирующаяся хорда не экспрессирует *Shh*, его экспрессия запускается позже в процессе развития хорды. *Shh* в нервной пластинке детектируется на высоком уровне в задней области, там, где не наблюдается экспрессии *Shh* в подлежащей хорде. Такой паттерн экспрессии *Shh* у эмбриона курицы ставит под сомнение представления классической модели дорсовентральной разметки нервной трубки.

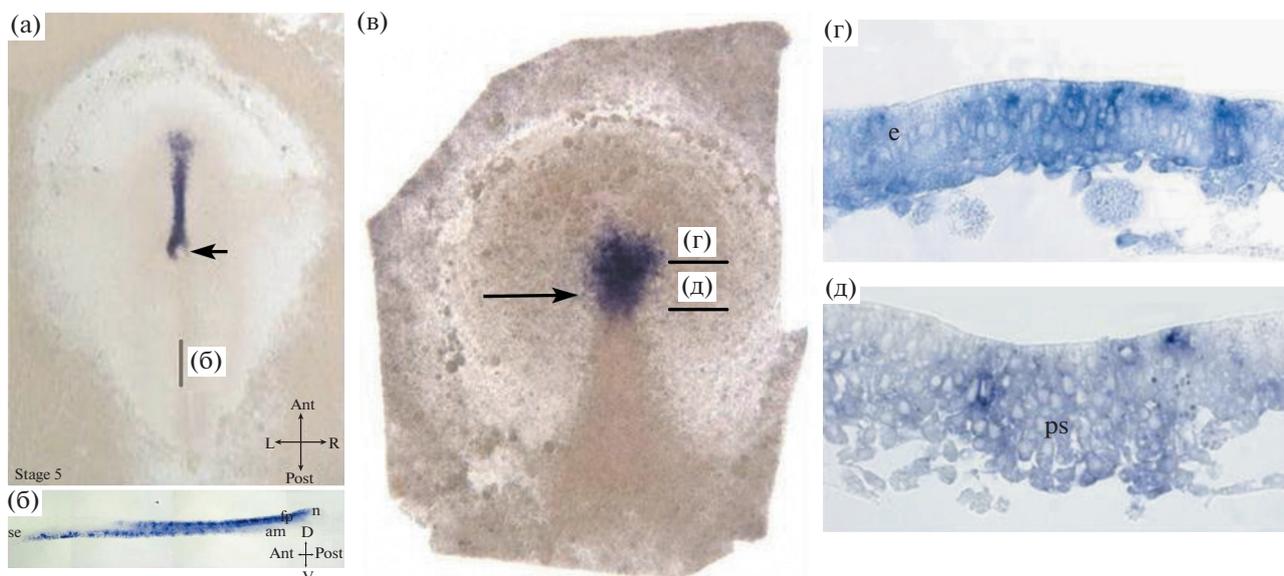
*Shh* экспрессируется в презумптивной области дна нервной трубки с самого начала формирования хорды. Поэтому встает вопрос, начинается ли экспрессия *Shh* до формирования гензеновского узелка и прехордальной пластинки? Удивительно, но сигнал *Shh* детектируется уже со стадии 2–3 НН (рис. 5в–5д). На данной стадии первичная полоска представляет собой сгущение клеток, вытянутое в направлении от заднего полюса к середине бластодиска. Ранее было показано, что на этой стадии область перед первичной полоской является областью презумптивного дна нервной трубки (Lopez-Sanchez et al., 2001). Именно в этой области выявляется сильная экспрессия *Shh*. Детальное исследование экспрессии *Shh* на этих стадиях было проведено на срезах (рис. 5г, 5д). Полученные данные говорят о том, что экспрессия *Shh* в области дна нервной трубки начинается еще до формирования хорды и, возможно, в данном случае, дно нервной трубки индуцирует экспрессию *Shh* в хорде (рис. 6). Таким образом, классическая модель дорсовентральной разметки нервной трубки не может быть применена к развитию птиц в той

форме, в которой она представлена в учебниках для всех позвоночных (рис. 6а).

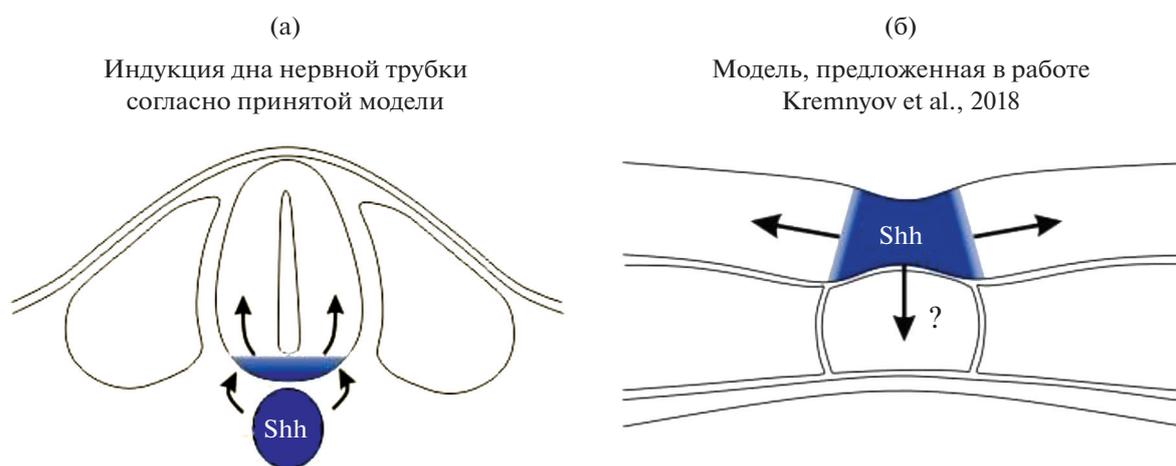
Безусловно, полученные недавно результаты ставят новый вопрос: имеется ли вероятность того, что у птиц индукцию разметки нервной трубки осуществляет другой представитель семейства морфогенов *Hedgehog*. Однако оказалось, что на исследованных стадиях развития (4–17 НН) экспрессия *Ihh* (*Indian Hedgehog*) и *Dhh* (*Desert Hedgehog*) не детектируется ни в хорде, ни в дне нервной трубки.

У шпорцевой лягушки экспрессия *Shh* в нервной пластинке детектируется уже на стадии поздней гаструлы. Следовательно, индукция экспрессии *Shh* в дне нервной трубки лягушки начинается рано, задолго до сворачивания нервной трубки. Однако до сих пор остается неизвестным, индуцируется ли ранняя экспрессия *Shh* в дне нервной трубки амфибий дорсальной мезодермой. Имеются свидетельства того, что экспрессия *Shh* в дне нервной пластинки лягушки активируется по умолчанию. Это происходит даже на фоне подавления активности *Shh* с помощью морфолино олигонуклеотидов или циклопомина (Peugot et al., 2011). Эти данные являются весомым аргументом в пользу первичной активации экспрессии *Shh* в клетках дна нервной пластинки. В этой же работе имеются дополнительные свидетельства в пользу первичной активации *Shh* в нервной пластинке. В экспериментах по активации Notch сигнального каскада в развитии *Xenopus* были получены эмбрионы с нарушениями формирования осевого комплекса, у которых отсутствовала корреляция между экспрессией *Shh* в клетках дна нервной трубки и подлежащей хорды. Так, у эмбрионов, хорда которых не была сформирована, а мезодермальные источники сигналов *Shh* отсутствовали, в нервной пластинке наблюдалась экспрессия *Shh*. В то же время, у тех эмбрионов, у которых экспрессия *Shh* наблюдалась в хорде, экспрессия *Shh* в нервной пластинке отсутствовала (Peugot et al., 2011).

Данные по пространственному паттерну экспрессии *Shh*, полученные на шпорцевой лягушке, позволяют предположить, что разметка нервной трубки у амфибий идет в планарной плоскости, вдоль медио-латеральной оси, а не вдоль дорзовентральной, как описывает классическая модель, вероятно справедливая для развития млекопитающих. Такой вариант разметки нервной трубки может быть связан с особенностями ее формирования у амфибий. У них она формируется только путем сворачивания нервной пластинки. В отличие от амфибий, у млекопитающих нейруляция идет как путем сворачивания эпителиального пласта в более передних областях эмбриона (первичная нейруляция), так и путем кавитации (вторичная нейруляция). Таким образом, можно предположить, что топографические особенности развития нервной системы амфибий определяют особенности ее молекулярной разметки.



**Рис. 5.** Пространственная динамика экспрессии *Shh* в развитии курицы. (а, в): тотальные препараты эмбрионов на стадии 5 (а), и 2+/3– (в); сагиттальный срез эмбриона на стадии 5 (б); (г, д) поперечные срезы эмбрионов на стадии 2+/3– НН на уровнях указанных на (в). На (а) стрелка указывает на положение гензеновского узелка; на (в) стрелкой указана anteriорная граница первичной полосы. Обозначения: fp – дно нервной трубки, am – осевая мезодерма, n – узелок, pm – прехордальная мезодерма (из Kremnyov et al., 2018, используется по лицензии CC BY 4.0).



**Рис. 6.** (а) Классическая универсальная модель становления дорзовентрального градиента *Shh* в нервной трубке у позвоночных. Согласно данной модели, хорда, расположенная под нервной трубкой, продуцирует *Shh*, который в свою очередь индуцирует выработку *Shh* в клетках дна нервной трубки. (б) Модификация модели молекулярной разметки нервной трубки у птиц, предложенная в работе Kremnyov et al., 2018. Согласно данной модели для экспрессии *Shh* в дне нервной трубки у птиц не требуется получения индукционного сигнала от подлежащей хорды. Экспрессия *Shh* у птиц в хорде наблюдается уже после ее активации в дне нервной трубки. Можно предположить, что если в данной модели имеются индукционные взаимодействия между клетками дна нервной трубки и хорды, то индукция идет в обратном направлении в сравнении с классической моделью: клетки дна нервной трубки индуцируют экспрессию *Shh* хорде (по Kremnyov et al., 2019).

Имеется небольшое количество данных по динамике экспрессии генов *Hedgehog* у представителей низших хордовых. У ланцетника был описан один ген этого семейства (Shimeld et al., 1999), в то время как у асцидии *Ciona intestinalis* было обнаружено два паралога *Hedgehog* (*Ci-hh1* and *Ci-hh2*), которые появились в результате независимой дупликации (Takatori et al., 2020). Анализ пространственной экспрессии этих генов в развитии *Ciona*

показал, что транскрипты *Ci-hh1* присутствуют в зиготе, но на стадии гастролы уже не детектируются методом гибридизации *in situ*. *Ci-hh2* экспрессируется в вентральных клетках нервной трубки, а в хорде его экспрессия не детектируется ни на одной стадии развития. Экспрессия гена *Hedgehog* у асцидий в вентральных клетках нервной трубки может быть связана с ранней детерминацией клеточных клонов и уменьшением роли индукционных взаи-

модействий в их развитии. У ланцетника экспрессия *Hedgehog* наблюдается сначала в эндодерме и хорде, а уже потом в дне нервной трубки. С учетом филогенетического положения ланцетника, именно таким мог быть предковый механизм индукции дифференцировки дна нервной трубки (Shimeld et al., 1999). Однако, данные для ланцетника были получены методом гибридизации *in situ* на целых эмбрионах. Для подтверждения полученных данных должно быть проведено исследование паттерна экспрессии *Hedgehog* на срезах.

Сравнительный анализ паттернов экспрессии гена *Hedgehog* в развитии хордовых указывает на эволюционные различия в свойствах хорды как организатора, участвующего в разметке нервной трубки и дифференцировке ее дна (рис. 7). Некоторые авторы предполагают, что тип спецификации дна нервной трубки у хордовых подстраивается под изменяющуюся топографию тканей, взаимодействующих в процессе гастрюляции и формирования хорды. Это свидетельствует об эволюционной пластичности процессов ранней эмбриональной индукции (Kremnyov et al., 2018).

Большинство исследований, посвященных молекулярным механизмам дорзовентральной разметки нервной трубки, проводят на эмбрионах курицы. Выявленные закономерности экстраполируют на всех позвоночных животных, считая их архетипическими. Полученные результаты даже пытаются применять при исследовании регенерации спинного мозга млекопитающих (Demers et al., 2016). Однако анализ имеющихся данных позволяет сделать вывод, что механизмы разметки нервной трубки принципиально различаются у птиц и млекопитающих, хотя конечный результат развития практически совпадает (Kremnyov et al., 2018).

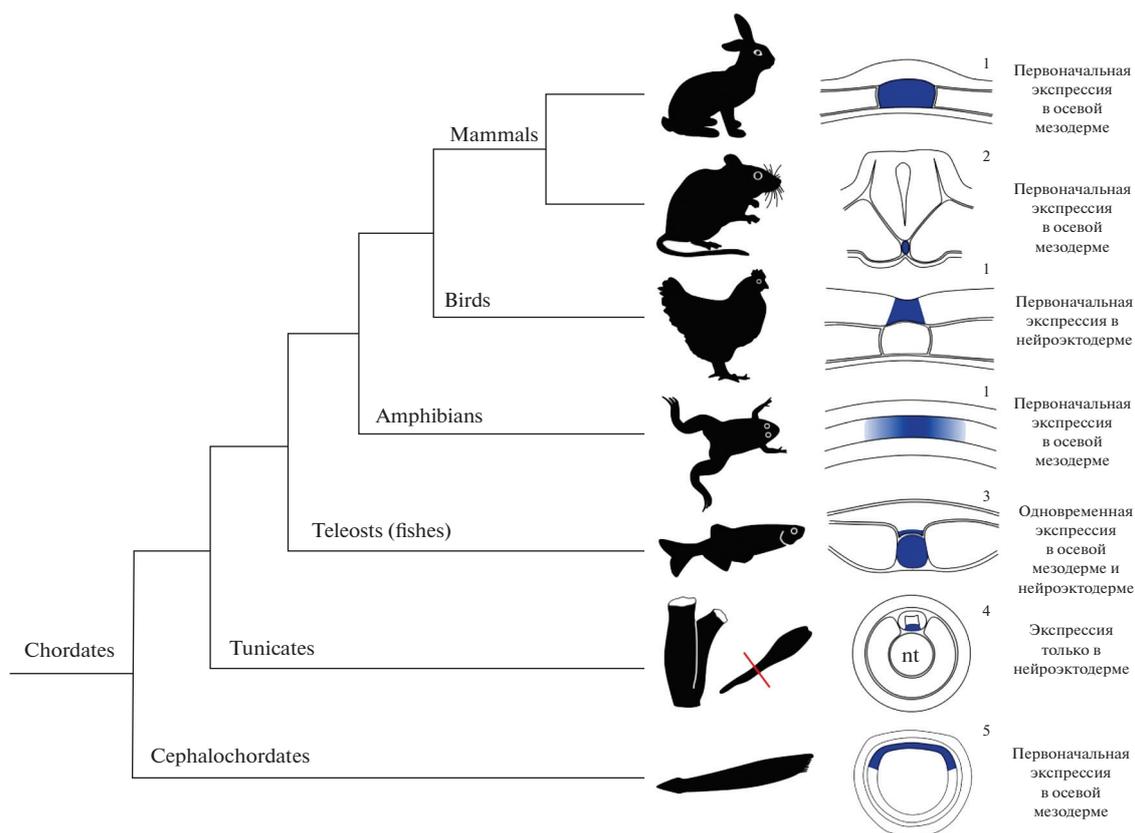
#### ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭНДОДЕРМЫ

Структура генных регуляторных сетей в развитии животных должна обладать достаточной эволюционной пластичностью. Это необходимая предпосылка для возникновения эволюционных инноваций, ответа на давление отбора и генетического дрейфа (Félix, Wagner, 2008; Peter, Davidson, 2011). Предполагается, что именно генетическая изменчивость, чаще всего нейтральная по отношению к приспособленности организма, обеспечивает пластичность структуры и работы генных регуляторных сетей (Félix, Wagner, 2008). Исследования лабораторных линий и штаммов модельных организмов внесли огромный вклад в понимание работы ключевых узлов генных регуляторных сетей в разнообразных процессах развития (Oliveri et al., 2008; Peter et al., 2017). Однако такой подход не позволяет раскрыть эволюционную роль пластичности этих сетей. Изменчивость функций и архитектуры генных регуляторных сетей может быть выявлена

путем анализа фенотипических различий, которые являются результатом естественной генетической изменчивости, присутствующей в отдельных изолятах того или иного вида (Phinchongsakuldit et al., 2004; Milloz et al., 2008; Nunes et al., 2013). Как должны быть устроены генные регуляторные сети, чтобы обеспечивать устойчивость процессов развития? Структура каких узлов этих сетей является пластичной, а каких — “закреплена” более жестко?

Свойства генных регуляторных сетей наиболее перспективно изучать на модельных системах, которые возникли на ранних этапах эволюции. Одной из таких удачных моделей может служить процесс дифференцировки эндодермы, которая возникла еще до появления билатерально симметричных животных, около 600 млн лет назад (Peterson et al., 2004). Несомненно, генные регуляторные сети, участвующие в спецификации эндодермы у современных животных, претерпели существенные модификации за долгий период эволюции. Однако транскрипционный аппарат дифференцировки эндодермы имеет общие черты у представителей всех ветвей филогенетического древа Metazoa. Например, каскады факторов транскрипции семейства GATA участвуют в развитии эндодермы не только у трехслойных животных, но и у большинства остальных Metazoa, включая кишечнополостных (Davidson et al., 2002; Martindale et al., 2004; Boyle, Seaver, 2010). Одно из исследований, подтверждающих консервативность регуляторного механизма спецификации эндодермы, показало, что фактор из семейства GATA нематоды *C. elegans*, END-1, способен активировать развитие эндодермы из клеток презумптивной эктодермы шпорцевой лягушки (Shoichet et al., 2000). Эти результаты указывают на то, что транскрипционные факторы GATA участвовали в формировании эндодермы еще у общего предка нематод и позвоночных.

Нематода *C. elegans* имеет детерминированное развитие. В ходе дробления, в результате нескольких асимметричных делений, возникает несколько клеток предшественников: AB, MS, E, C, D и P4 (рис. 8). Кишечник *C. elegans* полностью формируется из бластомера E (Sulston et al., 1983). Детерминированное развитие представляет собой высоко воспроизводимую систему. Этот тип развития предоставляет уникальные возможности для изучения спецификации и дифференцировки эндодермы. На сегодняшний день мы достаточно подробно представляем картину генных регуляторных сетей участвующих в дифференцировке эндодермы лабораторной линии N2. Каскад дифференцировки начинается с того, что материнский фактор SKN-1/Nrf активирует экспрессию GATA-подобных факторов *MED (MesEnDoderm)-1* и *MED-2*, а также канонических GATA факторов *END-3* и *END-1*. Далее этот процесс приводит к активации *ELT-7* и *ELT-2* в бластомере E, которые участвуют в морфогенезе кишечника и диффе-



**Рис. 7.** Паттерн экспрессии *Shh* в ходе развития осевых структур хордовых в контексте эволюции. 1 – Kremnyov et al., 2019, 2 – Chamberlain et al., 2008, 3 – Krauss et al., 1993, 4 – Takatori et al., 2002, 5 – Shimeld, 1999 (по Kremnyov et al., 2019).

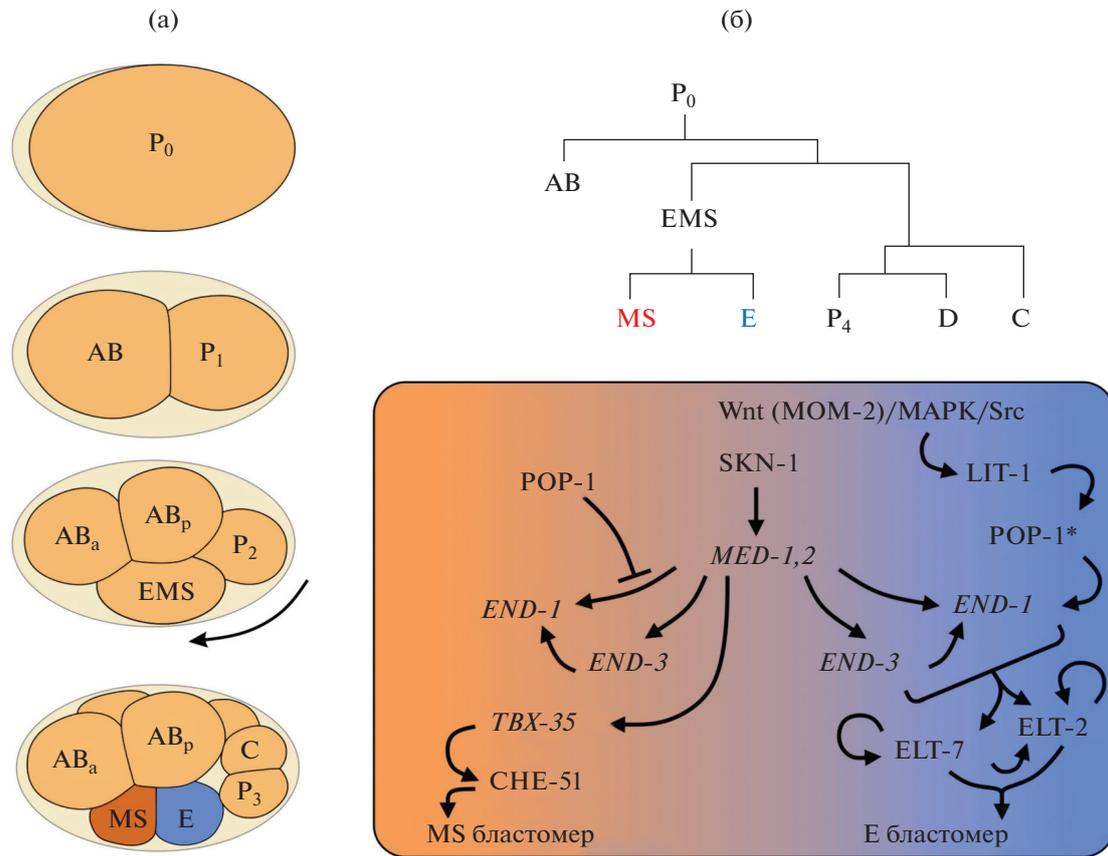
ренцировке его клеток (Sommermann et al., 2010; Dineen et al., 2018). Однако факторы *SKN-1* и *MED-1/2* активируются не только в бластомере E, но и в сестринском бластомере MS, в котором они участвуют в дифференцировке мезодермы (рис. 8).

Для запуска механизма дифференцировки бластомера E по пути эндодермы необходима работа сигнального каскада Wnt/MAPK/Src. Активация этого механизма происходит в тот момент, когда бластомер P2 индуцирует поляризацию мезэндодермальной клетки EMS, а в результате происходит регион-специфическая активация POP-1/TCF (Phillips et al., 2007; Owrighi et al., 2010). Далее в клетке MS POP-1 подавляет экспрессию *END-1* и *END-2*, блокируя дифференцировку этой клетки в направлении эндодермы. В то же время, индукционный сигнал, исходящий от клетки P2, приводит к фосфорилированию POP-1 в более задней клетке E, превращая POP-1 из ингибитора эндодермы в активатора.

Регуляторные взаимодействия между *SKN-1* и POP-1, который является эффекторной молекулой Wnt каскада, демонстрируют значительное разнообразие у видов нематод рода *Caenorhabditis*, которые разошлись около 30 млн лет назад. Таким образом, для ключевого узла генной регуляторной сети дифференцировки эндодермы характерна вы-

сокая эволюционная пластичность. Было показано, что нокаун гена *SKN-1* у *C. elegans* приводит к подавлению дифференцировки производных бластомера MS и отсутствию кишечника у развивающихся эмбрионов. При нокауне гена *POP-1* происходит дифференцировка второго эктопического кишечника из клетки MS. Совершенно другую картину можно наблюдать при нокауне этих генов у *C. briggsae*. Подавление экспрессии гена *SKN-1* приводит у нее к отсутствию формирования кишечника и не влияет на формирование производных бластомера MS. В то же время подавление экспрессии *POP-1* приводит к трансформации E бластомера в MS и отсутствию кишечника. Полученные результаты ярко демонстрируют, что у видов рода *Caenorhabditis* интеграция Wnt-зависимых и Wnt-независимых траекторий определения судьбы клеток может идти разными путями (Lin et al., 2009).

Каковы генетические механизмы, регулирующие пластичность генных регуляторных сетей эндодермы у представителей одного вида? Авторы одного из исследований попытались ответить на этот вопрос используя методы количественной генетики в сочетании с методами молекулярной биологии развития (Cleuren et al., 2019). Для этого они создали широкую коллекцию изотипов (ин-



**Рис. 8.** Асимметричные деления дробления эмбриона *Caenorhabditis elegans* и генная регуляторная сеть дифференцировки эндодермы. (а) В ходе асимметричных делений дробления эмбриона *C. elegans* возникают шесть клеток-основателей, каждая из которых дает начало определенным типам тканей. На четырехклеточной стадии SKN-1 активирует гены *MED-1,2*, инициируя спецификацию мезэндодермальной клетки (EMS). Соседний к ней blastomere P2 поляризует клетку EMS (индукция показана стрелкой) за счет сигналов Wnt/MAPK/Src. (б) На anteriornom полюсе EMS клетки POP-1 подавляют экспрессию генов *END-1* и *END-2*, а *MED-1,2* включает *Tbx-35*, который в свою очередь определяет судьбу дочерней мезодермальной клетки MS. На posteriornom полюсе EMS клетки киназа LIT-1 в ответ на индукционные сигналы blastomera P2 фосфолирует POP-1\*, превращая его из репрессора в активатор дифференцировки эндодермы из дочернего blastomera E. Далее, факторы дифференцировки ELT-7 и ELT-2 регулируют экспрессию генов, ответственных за спецификацию эндодермы (по Ewe et al., 2020).

бредных вариантов) *C. elegans*, что позволило получить платформу для анализа эволюции сложных признаков и модификации генных регуляторных сетей в развитии *C. elegans*.

Эти авторы показали, что у *C. elegans* имеется высокая внутривидовая изменчивость механизмов активации генной регуляторной сети спецификации эндодермы. Они начали работу с исследования роли центрального узла генной регуляторной сети SKN-1 у разных линий *C. elegans*. Для этого использовались методы интрогрессии мутантных аллелей генов и РНК интерференции (RNAi). RNAi *SKN-1* приводит к 100% смертности эмбрионов стандартной лабораторной линии N2. Однако у 30% эмбрионов успевае дифференцироваться кишечник. Оценку количества эмбрионов с дифференцированным кишечником проводили по наличию специфичных для кишечника гранул рабдитина, экспрессии специфических марке-

ров *elt-2::GFP* и промежуточных филаментов *IFB-2*. Далее авторы проверили необходимость *SKN-1* для спецификации эндодермы у большого количества изолятов *C. elegans*. У всех изолятов, кроме гавайского штамма CB4852 RNAi *SKN-1* приводила к 100% смертности эмбрионов, однако количество эмбрионов с развитым кишечником сильно различалось и варьировало от 0.9 до 60% для разных линий. При интрогрессии мутантного аллеля *SKN-1* авторы получали сходный результат. Также в работе было показано, что доля особей, у которых успевае дифференцироваться кишечник после RNAi *SKN-1*, не зависит от филогенетического положения и географического происхождения линий. Полученные результаты показывают, что сигнальные системы активации генной регуляторной сети спецификации эндодермы у *C. elegans* подвержены крайне быстрой дивергенции, то есть обладают высокой эволюционной пластичностью.

Итак, было показано, что роли SKN-1 и Wnt в генной регуляторной сети эндодермы различаются у *C. elegans* и *C. briggsae*, а SKN-1 имеет разное значение для спецификации эндодермы в разных изолятах *C. elegans*. Эти данные позволяют предположить, что и активность Wnt каскада при дифференцировке эндодермы может различаться между изолятами *C. elegans*. Следующим шагом данного исследования было выяснение роли лиганда MOM-2/Wnt в дифференцировке эндодермы у тех же диких изолятов, которые были протестированы в экспериментах с подавлением экспрессии SKN-1. При RNAi MOM-2 кишечник формировался у 40–99% эмбрионов, в зависимости от изолята. Корреляций между наборами фенотипов, полученных в результате RNAi MOM-2, и филогенетическим положением/географическим распределением изолятов *C. elegans* также выявлено не было. То есть у филогенетически (географически) удаленных друг от друга линий могли наблюдаться одинаковые наборы фенотипов. Подавление экспрессии POP-1, хоть и было летальным для всех изолятов, не влияло на подавление процесса спецификации эндодермы. Количественный генетический анализ природных и рекомбинантных популяций выявил множественные локусы, лежащие в основе изменчивости потребности в SKN-1 и MOM-2 для спецификации эндодермы. Весь комплекс полученных данных позволил предложить модель компенсаторных отношений между SKN-1 и MOM-2.

Архитектура генных регуляторных сетей изменяется в том числе и при эволюции *cis*-регуляторных последовательностей (Peter, Davidson, 2011). Поэтому анализ изменчивости последовательностей мишеней SKN-1 и Wnt/POP-1 у диких изолятов *C. elegans* поможет понять, как генетические изменения подстраиваются к генетической сети без ущерба для процесса развития в микроэволюционном масштабе времени.

Результаты данного исследования позволяют понять, что информация, полученная в ходе изучения молекулярных механизмов развития на одной лабораторной линии животных, не должна переноситься на весь вид. Только исследования на популяционном уровне позволят раскрыть универсальные принципы регуляции развития, а не только роль отдельных регуляторных белков у отдельных лабораторных линий животных.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы продемонстрировали эволюционную и индивидуальную пластичность сигнальных каскадов на примере нескольких процессов, наблюдающихся в развитии позвоночных и беспозвоночных животных.

Имеющиеся данные позволяют усомниться в том, что эволюционные изменения сигнальных каскадов — первопричина появления новых планов строения. Модификации каскадов могут яв-

ляться следствием давления естественного отбора, направленного на поддержание того или иного плана строения в условиях изменившегося эмбрионального развития. Индивидуальная и эволюционная пластичность генных регуляторных сетей является необходимой предпосылкой для устойчивого формирования признаков в онто- и филогенезе. Несомненно, описанный феномен индивидуальной пластичности сигнальных каскадов имеет большое значение и для медицины. Именно это явление может приводить к тому, что два человека с одним и тем же заболеванием, или унаследовавшие одну и ту же мутацию, проявляют разные симптомы и по-разному реагируют на лечение.

Анализ представленных данных показывает, что редуccionистский подход к изучению сигнальных каскадов, не позволяет выявить универсальные для Metazoa принципы регуляции развития. Прогресс в изучении регуляции развития ограничивается небольшим набором модельных объектов, искажающим наши представления о разнообразии и пластичности сигнальных каскадов. Активные исследования в областях эволюционной биологии развития (EvoDevo) и экологической биологии развития (EcoEvoDevo), связанные с использованием широкого круга филогенетически репрезентативных моделей, позволят преодолеть эти ограничения.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, “Экспансия”, 20-14-50526. Выполнено в рамках раздела Государственного задания ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН 2021 г. № ГЗ 0088-2021-0009 и научного проекта государственного задания МГУ № 121032300066-4.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson C., Stern C.D. Organizers in development // Curr. Top. Dev. Biol. 2016. V. 117. P. 435–454.
- Bachiller D., Klingensmith J., Shneyder N., Tran U., Anderson R., Rossant J., De Robertis E.M. The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome // Development. 2003. V. 130. № 15. P. 3567–3578.
- Bier E., De Robertis E.M. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning // Science. 2015. V. 348. № 6242. P. 1–12.
- Boyle M.J., Seaver E.C. Expression of FoxA and GATA transcription factors correlates with regionalized gut de-

- velopment in two lophotrochozoan marine worms: chaetopterus (Annelida) and *Themiste lageniformis* (Sipuncula) // *EvoDevo*. 2010. V. 1. P. 1–18.
- Brekhan V., Malik A., Haas B., She N., Lotan T. Transcriptome profiling of the dynamic life cycle of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* // *BMC genomics*. 2015. V. 16. № 1. P. 1–15.
- Carroll S.B. Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity // *Cell*. 2000. V. 101. № 6. P. 577–580.
- Cary G.A., Hinman V.F. Echinoderm development and evolution in the post-genomic era // *Dev. Biol.* 2017. V. 427. № 2. P. 203–211.
- Chapman J.A., Kirkness E.F., Simakov O., Hampson S.E., Mitros T., Weinmaier T., Rattei T., Balasubramanian P.G., Borman J., Busam D., Disbennett K. The dynamic genome of *Hydra* // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 592–596.
- Chizhikov V.V., Millen K.J. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system // *Dev. Biol.* 2005. V. 277. P. 287–295.
- Christen B., Slack J.M. All limbs are not the same // *Nature*. 1998. V. 395. № 6699. P. 230.
- Cohen M., Briscoe J., Blassberg R. Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. P. 423–428.
- Cleuren Y.N.T., Ewe C.K., Chipman K.C., Mears E.R., Wood C.G., Al-Alami C.E.A., Alcorn M.R., Turner T.L., Joshi P.M., Snell R.G., Rothman, J.H. Extensive intra-species cryptic variation in an ancient embryonic gene regulatory network // *Elife*. 2019. V. 8. P. e48220.
- Davidson E.H., Rast J.P., Oliveri P., Ransick A., Calestani C., Yuh C.H., Minokawa T., Amore G., Hinman V., Arenas-Mena C., Otim O., Brown C.T., Livi C.B., Lee P.Y., Revilla R., Schilstra M.J., Clarke P.J., Rust A.G., Pan Z., Arnone M.I., Rowen L., Cameron R.A., McClay D.R., Hood L., Bolouri H. A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo // *Dev. Biol.* 2002. V. 246. P. 162–190.
- Demers C.J., Soundararajan P., Chennampally P., Cox G.A., Briscoe J., Collins S.D., Smith R.L. Development-on-chip: *in vitro* neural tube patterning with a microfluidic device // *Development*. 2016. V. 143. № 11. P. 1884–1892.
- Dineen A., Osborne N.E., Goszczynski B., Rothman J.H., McGhee J.D. Quantitating transcription factor redundancy: the relative roles of the ELT-2 and ELT-7 GATA factors in the *C. elegans* endoderm // *Dev. Biol.* 2018. V. 435. P. 150–161.
- Echelard Y., Epstein D.J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J.A., McMahon A.P. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity // *Cell*. 1993. V. 75. № 7. P. 1417–1430.
- Ereskovsky A.V., Renard E., Borchiellini C. Cellular and molecular processes leading to embryo formation in sponges: evidences for high conservation of processes throughout animal evolution // *Dev. Gen. Evol.* 2013. V. 223. № 1–2. P. 5–22.
- Ewe C.K., Torres Cleuren Y.N., Rothman J.H. Evolution and developmental system drift in the endoderm gene regulatory network of *Caenorhabditis* and other nematodes // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. V. 8. P. 170.
- Félix M.A., Wagner A. Robustness and evolution: concepts, insights and challenges from a developmental model system // *Heredity*. 2008. V. 100. P. 132–140.
- Finnerty J.R., Pang K., Burton P., Paulson D., Martindale M.Q. Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone // *Science*. 2004. V. 304. № 5675. P. 1335–1337.
- Gavino M.A., Reddien P.W. A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians // *Current Biology*. 2011. V. 21. № 4. P. 294–299.
- Genikhovich G. How Do Developmental Programs Evolve? Old Questions and Young Approaches to Animal Evolution. Springer, Cham., 2019. P. 73–106.
- Genikhovich G., Fried P., Prünster M.M., Schinko J.B., Gilles A.F., Fredman D., Meier K., Iber D., Technau U. Axis patterning by BMPs: cnidarian network reveals evolutionary constraints // *Cell Reports*. 2015. V. 10. № 10. P. 1646–1654.
- Genikhovich G., Technau U. On the evolution of bilaterality // *Development*. 2017. V. 144. № 19. P. 3392–3404.
- Gline S.E., Kuo D.H., Stolfi A., Weisblat D.A. High resolution cell lineage tracing reveals developmental variability in leech // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. № 12. P. 3139–3151.
- Goulding M., Lanuza G., Sapir T., Narayan S. The formation of sensorimotor circuits // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002. V. 12. P. 508–515.
- Halpern M.E., Ho R.K., Walker C., Kimmel C.B. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation // *Cell*. 1993. V. 75. P. 99–111.
- Hamburger V., Hamilton H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo // *J. Morphol.* 1951. V. 88. № 1. P. 49–92.
- Hayward D.C., Samuel G., Pontynen P.C., Catmull J., Saint R., Miller D.J., Ball E.E. Localized expression of a dpp/BMP2/4 ortholog in a coral embryo // *PNAS*. 2002. V. 99. № 12. P. 8106–8111.
- Huang F.Z., Weisblat D.A. Cell fate determination in an annelid equivalence group // *Development*. 1996. V. 122. № 6. P. 1839–1847.
- Jeong J., McMahon A.P. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1 // *Development*. 2005. V. 132. № 1. P. 143–154.
- Jessell T.M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes // *Nature Reviews Genetics*. 2000. V. 1. № 1. P. 20–29.
- Ishihara K., Ranga A., Lutolf M.P., Tanaka E.M., Meinhardt A. Reconstitution of a patterned neural tube from single mouse embryonic stem cells // *Organ Regeneration*. Humana Press, N.Y., 2017. P. 43–55.
- Kherdjemil Y., Lalonde R.L., Sheth R., Dumouchel A., de Martino G., Pineault K.M., Wellik D.M., Stadler H.S., Akimenko M.A., Kmita M. Evolution of Hoxa11 regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state // *Nature*. 2016. V. 539. № 7627. P. 89.
- Kraus J.E., Fredman D., Wang W., Khalturin K., Technau U. Adoption of conserved developmental genes in development and origin of the medusa body plan // *EvoDevo*. 2015. V. 6. № 1. P. 1–15.
- Kremnyov S., Henningfeld K., Viebahn C., Tsikolia N. Divergent axial morphogenesis and early shh expression in vertebrate prospective floor plate // *EvoDevo*. 2018. V. 9. № 1. P. 1–17.

- Kuo D.H., Shankland M. Evolutionary diversification of specification mechanisms within the O/P equivalence group of the leech genus *Helobdella* // *Development*. 2004. V. 131. № 23. P. 5859–5869.
- Kuo D.H., Weisblat D.A. A new molecular logic for BMP-mediated dorsoventral patterning in the leech *Helobdella* // *Current Biology*. 2011. V. 21. № 15. P. 1282–1288.
- Liem K.F. Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm // *Cell*. 1995. V. 82. P. 969–979.
- Lin K.T.H., Broitman-Maduro G., Hung W.W., Cervantes S., Maduro M.F. Knockdown of SKN-1 and the Wnt effector TCF/POP-1 reveals differences in endomesoderm specification in *C. briggsae* as compared with *C. elegans* // *Dev. Biol.* 2009. V. 325. № 1. P. 296–306.
- Martindale M.Q., Pang K., Finnerty J.R. Investigating the origins of triploblasty: ‘mesodermal’ gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa) // *Development*. 2004. V. 131. P. 2463–2474.
- Megason S.G., McMahon A.P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS // *Development*. 2002. V. 129. P. 2087–2098.
- Milloz J., Duveau F., Nuez I., Félix M.A. Intraspecific evolution of the intercellular signaling network underlying a robust developmental system // *Genes & Development*. 2008. V. 22. P. 3064–3075.
- Molina M.D., Neto A., Maeso I., Gómez-Skarmeta J.L., Saló E., Cebrià F. Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians // *Current Biology*. 2011. V. 21. № 4. P. 300–305.
- Nunes M.D., Arif S., Schlötterer C., McGregor A.P. A perspective on micro-*evo-devo*: Progress and potential // *Genetics*. 2013. V. 195. P. 625–634.
- Leclère L., Horin C., Chevalier S., Lapébie P., Dru P., Péron S., Jager M., Condamine T., Pottin K., Romano S., Steger J. The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle // *Nature Ecology & Evolution*. 2019. V. 3. № 5. P. 801–810.
- Le Douarin N.M., Halpern M.E. Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. P. 23–30.
- Levine M., Tjian R. Transcription regulation and animal diversity // *Nature*. 2003. V. 424. № 6945. P. 147.
- Lopez-Sanchez C., Garcia-Martinez V., Schoenwolf G.C. Localization of cells of the prospective neural plate, heart and somites within the primitive streak and epiblast of avian embryos at intermediate primitive-streak stages // *Cells, Tissues, Organs*. 2001. V. 169. P. 334–346.
- Oliveri P., Tu Q., Davidson E.H. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage // *PNAS*. 2008. V. 105. P. 5955–5962.
- Özük O., Buchta T., Roth S., Lynch J.A. Dorsoventral polarity of the *Nasonia* embryo primarily relies on a BMP gradient formed without input from Toll // *Current Biology*. 2014. V. 24. № 20. P. 2393–2398.
- Özük O., Buchta T., Roth S., Lynch J.A. Ancient and diverged TGF- $\beta$  signaling components in *Nasonia vitripennis* // *Development Genes and Evolution*. 2014. V. 224. № 4–6. P. 223–233.
- Owraghi M., Broitman-Maduro G., Luu T., Roberson H., Maduro M.F. Roles of the Wnt effector POP-1/TCF in the *C. elegans* endomesoderm specification gene network // *Dev. Biol.* 2010. V. 340. P. 209–221.
- Patten I., Kulesa P., Shen M.M., Fraser S., Placzek M. Distinct modes of floor plate induction in the chick embryo // *Development*. 2003. V. 130. P. 4809–4821.
- Pechmann M., Kenny N.J., Pott L., Heger P., Chen Y.T., Buchta T., Özük O., Lynch J., Roth S. Striking parallels between dorsoventral patterning in *Drosophila* and *Gryllus* reveal a complex evolutionary history behind a model gene regulatory network // *Elife*. 2021. V. 10. P. e68287.
- Peter I.S., Davidson E.H. Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development // *Cell*. 2011. V. 144. P. 970–985.
- Peter I.S., Davidson E.H. Assessing regulatory information in developmental gene regulatory networks // *PNAS*. 2017. V. 114. P. 5862–5869.
- Peterson K.J., Lyons J.B., Nowak K.S., Takacs C.M., Wargo M.J., McPeck M.A. Estimating metazoan divergence times with a molecular clock // *PNAS*. 2004. V. 101. P. 6536–6541.
- Peterson K.J., Davidson E.H. Regulatory evolution and the origin of the bilaterians // *PNAS*. 2000. V. 97. № 9. P. 4430–4433.
- Petersen C.P., Reddien P.W. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis // *Cell*. 2009. V. 139. № 6. P. 1056–1068.
- Peterson K.A., Nishi Y., Ma W., Vedenko A., Shokri L., Zhang X., McFarlane M., Baizabal J.M., Junker J.P., van Oudenaarden A., Mikkelsen T., Bernstein B.E., Bailey T.L., Bulyk M.L., Wong W.H., McMahon A.P. Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2802–2816.
- Peyrot S.M., Wallingford J.B., Harland R.M. A revised model of *Xenopus* dorsal midline development: differential and separable requirements for Notch and Shh signaling // *Dev. Biol.* 2011. V. 352. P. 254–256.
- Phinchongsakuldit J., Mac Arthur S., Brookfield J.F. Evolution of developmental genes: molecular microevolution of enhancer sequences at the *ubx* locus in *Drosophila* and its impact on developmental phenotypes // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. V. 21. P. 348–363.
- Phillips B.T., Kidd A.R., King R., Hardin J., Kimble J. Reciprocal asymmetry of SYS-1/beta-catenin and POP-1/TCF controls asymmetric divisions in *Caenorhabditis elegans* // *PNAS*. 2007. V. 104. P. 3231–3236.
- Ranga A., Girgin M., Meinhardt A., Eberle D., Caiazza M., Tanaka E.M., Lutolf M.P. Neural tube morphogenesis in synthetic 3D microenvironments // *PNAS*. 2016. V. 113. № 44. P. E6831–E6839.
- Reber-Muller S., Streitwolf-Engel R., Yanze N., Schmid V., Stierwald M., Erb M., Seipel K. BMP2/4 and BMP5-8 in jellyfish development and transdifferentiation // *International J. Developmental Biology*. 2004. V. 50. № 4. P. 377–384.
- Reinhardt B., Broun M., Blitz I.L., Bode H.R. HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra // *Dev. Biol.* 2004. V. 267. № 1. P. 43–59.
- Rentzsch F., Anton R., Saina M., Hammerschmidt M., Holstein T.W., Technau U. Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning // *Dev. Biol.* 2006. V. 296. № 2. P. 375–387.

- Rentzsch F., Guder C., Vocke D., Hobmayer B., Holstein T.W.* An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra // PNAS. 2007. V. 104. № 9. P. 3249–3254.
- Reversade B., De Robertis E.M.* Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field // Cell. 2005. V. 123. № 6. P. 1147–1160.
- Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E., Tabin C.* Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA // Cell. 1993. V. 75. № 7. P. 1401–1416.
- Seki R., Li C., Fang Q., Hayashi S., Egawa S., Hu J., Xu L., Pan H., Kondo M., Sato T., Matsubara H.* Functional roles of Aves class-specific cis-regulatory elements on macroevolution of bird-specific features // Nature Communications. 2017. V. 8. P. 14229.
- Saina M., Genikhovich G., Renfer E., Technau U.* BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone // PNAS. 2009. V. 106. № 44. P. 18592–18597.
- Schauerte H.E., van Eeden F.J., Fricke C., Odenthal J., Strahle U., Hafjter P.* Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish // Development. 1998. V. 125. P. 2983–2993.
- Shih J., Fraser S.E.* Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage // Development. 1996. V. 122. P. 1313–1322.
- Shilo B.Z., Haskel-Ittah M., Ben-Zvi D., Schejter E.D., Barkai N.* Creating gradients by morphogen shuttling // Trends in Genetics. 2013. V. 29. № 6. P. 339–347.
- Shimeld S.M.* The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog // Dev. Genes Evol. 1999. V. 209. P. 40–47.
- Shoichet S.A., Malik T.H., Rothman J.H., Shivdasani R.A.* Action of the *Caenorhabditis elegans* GATA factor END-1 in *Xenopus* suggests that similar mechanisms initiate endoderm development in ecdysozoa and vertebrates // PNAS. 2000. V. 97. P. 4076–4081.
- Smith J.L., Schoenwolf G.C.* Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation // Journal of Experimental Zoology. 1989. V. 250. № 1. P. 49–62.
- Sommermann E.M., Strohmaier K.R., Maduro M.F., Rothman J.H.* Endoderm development in *Caenorhabditis elegans*: the synergistic action of ELT-2 and -7 mediates the specification→differentiation transition // Dev. Biol. 2010. V. 347. P. 154–166.
- Sulston J.E., Albertson D.G., Thomson J.N.* The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures // Dev. Biol. 1980. V. 78. P. 542–576.
- Takatori N., Satou Y., Satoh N.* Expression of hedgehog genes in *Ciona intestinalis* embryos // Mech. Dev. 2002. V. 116. P. 235–238.
- Tan S., Huan P., Liu B.* Expression patterns indicate that BMP2/4 and Chordin, not BMP5-8 and Gremlin, mediate dorsal–ventral patterning in the mollusk *Crassostrea gigas* // Development Genes and Evolution. 2017. V. 227. № 2. P. 75–84.
- Van Straaten H.W.M., Hekking J.W.M., Wiertz-Hoessels E.J.L.M., Thors F., Drukker J.* Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo // Anatomy and Embryology. 1988. V. 177. № 4. P. 317–324.
- Wang Y.C., Ferguson E.L.* Spatial bistability of Dpp–receptor interactions during *Drosophila* dorsal–ventral patterning // Nature. 2005. V. 434. № 7030. P. 229–234.
- Watanabe H., Schmidt H.A., Kuhn A., Höger S.K., Kocagöz Y., Laumann-Lipp N., Özbek S., Holstein T.W.* Nodal signalling determines biradial asymmetry in Hydra // Nature. 2014. V. 515. № 7525. P. 112–115.
- Weisblat D.A., Kim S.Y., Stent G.S.* Embryonic origins of cells in the leech *Helobdella triserialis* // Dev. Biol. 1984. V. 104. № 1. P. 65–85.
- Weisblat D.A., Shankland M.* Cell lineage and segmentation in the leech // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences. 1985. V. 312. № 1153. P. 39–56.
- Willmore K.E.* The body plan concept and its centrality in evo-devo // Evolution: Education and Outreach. 2012. V. 5. № 2. P. 219–230.

## Evolutionary and Ontogenetic Plasticity of Conserved Signaling Pathways in Animals' Development

S. V. Kremnev<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, building 12, Moscow, 119923 Russia

<sup>2</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: s.kremnyov@gmail.com

The notion that the signaling pathway involved in the regulation of animals' key developmental processes (body axis formation, germ layers specification, embryonic induction) are highly conservative dominates in Evolutionary Developmental Biology (EvoDevo). At the same time, there are many pieces of evidence that these signaling pathways are extremely plastic. In this review, we analyze the evolutionary and ontogenetic plasticity of signaling cascades operating in the development of several model species. Studies on the plasticity of molecular regulatory mechanisms are necessary for understanding the basic patterns of animal evolution and for the improvement of biomedical technics as well. Our review will allow readers to look at the concept of “conservatism” of molecular regulatory mechanisms in animal ontogeny and evolution from different angles.

**Keywords:** developmental plasticity, body plan, gene regulatory networks, signaling pathways, EvoDevo

## ОТКЛОНЕНИЯ В СТРОЕНИИ ЭФИР ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИИ СТРОБИЛЯЦИИ У *AURELIA AURITA* (SCYPHOZOA, CNIDARIA)

© 2022 г. П. С. Мостовщикова<sup>а, \*</sup>, Д. М. Саидов<sup>б</sup>, И. А. Косевич<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Образовательный центр Сириус Краснодарский край, Олимпийский проспект, 40, Сочи, 354349 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: etonetoimail@gmail.com

Поступила в редакцию 14.08.2021 г.

После доработки 24.10.2021 г.

Принята к публикации 30.10.2021 г.

*Aurelia aurita* — представитель сцифоидных, одного из классов Стрекающих (Cnidaria), развитие и жизненный цикл которого достаточно хорошо изучены. В последние годы *A. aurita* часто выступает в качестве объекта изучения процессов развития Cnidaria, включая специфический вариант бесполого размножения путем стробилиации — формирование эфир (личинки медуз) за счет поперечного деления полипа. Естественным стимулом для начала стробилиации в большинстве случаев служит продолжительное снижение температуры. Необходимость длительной индукции и непредсказуемость результата затрудняет работу с этим модельным объектом. Поэтому для индукции стробилиации в лабораторных условиях часто используются различные синтетические химические соединения, строение которых приближено к таковому предполагаемого “гормона стробилиации”. В настоящей работе представлены данные об обнаруженных отклонениях в процессе отделения эфир и в их внешней морфологии при использовании 5-метокси-2-метилиндола для индукции стробилиации у *A. aurita* в лабораторных условиях. Впервые проведено сравнение наблюдавшихся в эксперименте отклонений в морфологии эфир с описанными в литературе отклонениями в морфологии эфир и медуз из природных популяций. Высказано предположение, что химическая индукция приводит к возрастанию частоты появления морфологических отклонений у формируемых в процессе стробилиации эфир на основе нарушения пространственной разметки и процессов дифференцировки зачатков.

**Ключевые слова:** Cnidaria, Scyphozoa, *Aurelia aurita*, полип, медуза, эфира, стробилиация, индукция стробилиации, 5-метокси-2-метилиндол, отклонения в строении

DOI: 10.31857/S0475145022020082

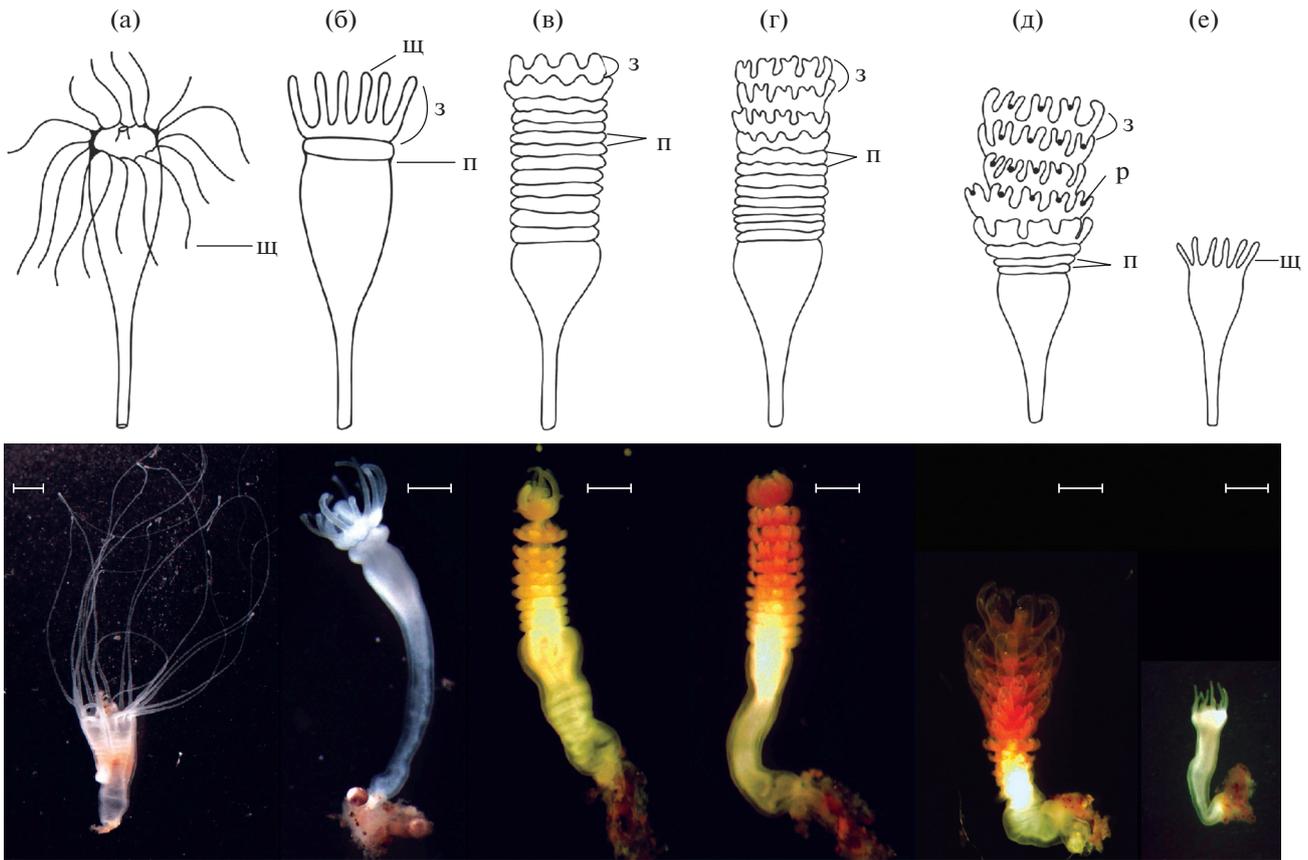
### ВВЕДЕНИЕ

Для решения вопросов регуляции процессов формообразования и развития многоклеточных животных все чаще обращают внимание на представителей низших многоклеточных (Догель, 1981; Brusca, Brusca, 2003; Technau et al., 2015; Zimmermann et al., 2019). Это связано с надеждами на то, что простота организации таких организмов облегчит понимание сложной системы регуляции, базовые принципы которой одинаковы для всех организмов (Technau, Steele, 2011; Genikhovich, 2019). Сцифомедуза *Aurelia aurita* является одним из наиболее изученных видов среди стрекающих, который в последнее время используется как модельный объект биологии развития (напр., Spangenberg, 1965a, 1965b, 1991; Yuan et al., 2008; Nakanishi et al., 2008, 2010; Gold et al., 2015; Khalturin et al., 2019).

Внимание биологов развития в последнее время привлекает процесс трансформации сцифопо-

липов в личинки медуз — эфиры, которые в дальнейшем постепенно развиваются в ювенильных медуз. Процесс трансформации начинается *стробилиацией* (терминальным почкованием) — подразделением тела полипа на фрагменты, из которых затем формируются личинки медуз — эфиры (рис. 1) (Иванова-Казас, 1977; Догель, 1981; Straehler-Pohl et al., 2011). Поиску генетических регуляторных механизмов этого процесса уделяется особое внимание (Kroiher et al., 2000; Fuchs et al., 2014; Brekhman et al., 2015; Gold et al., 2019).

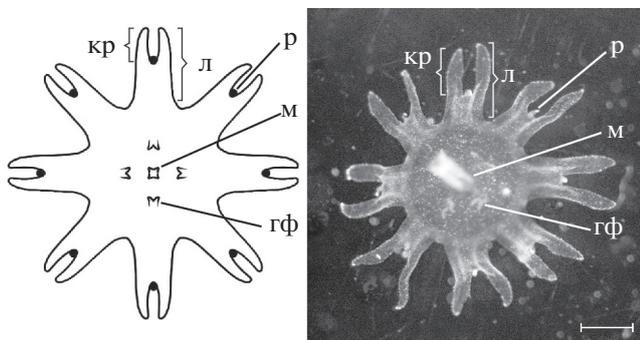
*Aurelia aurita* относится к видам с полидискоидной стробилиацией, в результате которой один полип дает начало нескольким эфирам (Berrill, 1949; Сухопутова, 2013; Sukhoputova et al., 2019). Для эфир данного вида характерно наличие восьми отростков — лопастей (рис. 2). На конце каждого такого отростка эфиры имеет развилку из двух краевых лопастей, в промежутке между которыми



**Рис. 1.** Стробилиция *Aurelia aurita*. Верхний ряд – схемы, нижний ряд – фотографии соответствующих стадий. (а) Полип до начала стробилизации, (б) стробила с первыми перетяжками; процесс подразделения тела полипа на зачатки эфир начинается в оральной части полипа и распространяется по направлению к аборальной части, (в) особь, переходящая на стадию средней стробилы, у зачатков, расположенных ближе к оральной части полипа, начинают формироваться лопасти, (г) средняя стробила; зачатки эфир, расположенные ближе к оральной части полипа, приобретают красный оттенок, продолжается развитие лопастей эфир, (д) поздняя стробила, полностью сформированные эфиры отделились, развитие личинок медуз продолжается в орально-аборальном направлении, (е) полип после стробилизации. з – зачаток эфиры, п – перетяжки, отделяющие зачатки эфир, р – ропалий, щ – щупальце полипа. Масштабные линейки равны 1 мм.

формируется комплекс органов чувств – ропалий. В норме ропалии первой (самой орально расположенной) эфиры закладываются в основа-

нии каждого второго щупальца полипа, начавшего стробилизацию, и который чаще всего имеет 16 щупалец (Browne, 1901; Spangenberg, 1991; Sukhoputova et al., 2019).



**Рис. 2.** Строение эфиры *Aurelia aurita*. гф – гастральные филаменты, кр – краевая лопасть, л – лопасть эфиры, м – манубриум, р – ропалий. Масштабная линейка 1 мм.

Отклонения в строении эфир, медуз и других стадий жизненного цикла *A. aurita* привлекали внимание в основном в конце 19–начале 20 вв. (Browne, 1895, 1901; обсуждение и ссылки в работах Hargitt, 1901; Berrill, 1949; Gershwin, 1999). По настоящее время отклонения в строении эфир должным образом не систематизированы, и отсутствует их подробный анализ. Одни авторы рассматривали только отклонения в числе ропалиев или лопастей у эфир и медуз от обычных восьми (Browne, 1895, 1901; Berrill, 1949); другие – обращали внимание на нарушение тетрамерной симметрии медуз и эфир (Gershwin, 1999), лишь упоминая другие отклонения. Встречаются описания отдельных необычных отклонений в строении вновь отделившихся эфир (Browne, 1895; Vannucci,

1957). Неисследованным остается и вопрос о влиянии тех или иных отклонений в строении эфир на дальнейшее формирование медуз (Uchida, Nagao, 1963; Hamner, Jenssen, 1974; Kakinuma, 1975; Miyake et al., 1997; Chernyshev, Isaeva, 2002; Заика, 2005; Straehler-Pohl et al., 2011).

Наиболее вероятным естественным фактором, который вызывает начало стробилиации у *A. aurita*, считается продолжительное снижение температуры окружающей среды, связанное со сменой времен года. Исследования показали, что искусственное снижение температуры на несколько градусов в лабораторных условиях может индуцировать стробилиацию по прошествии от нескольких недель до нескольких месяцев (Berrill, 1949; Spangenberg, 1965a, 1965b; Kakinuma, 1975; Sukhoputova, Kraus, 2017). Чувствительность полипов к снижению температуры может значительно отличаться у культур, которые перед индукцией долгое время содержались в разных температурных условиях, в том числе при индукции клональных культур (Сухопутова, Краус, 2017). Это ведет к необходимости подбора условий индукции для каждой отдельной группы полипов, что значительно затрудняет работу.

Изучение молекулярных механизмов регуляции стробилиации позволило выявить ген CL390, который активно транскрибируется при стробилиации (Fuchs et al., 2014; Wang, 2017). Белок, кодируемый данным геном, имеет сложное строение, в теле полипа он распадается на части, одна из которых, по-видимому, и играет основную роль в запуске каскада биохимических реакций, контролирующих протекание стробилиации. На основе строения этого вещества было предложено использование ряда синтетических гомологичных молекул – производных индола и триптофана, которые способны индуцировать стробилиацию в короткие сроки: от двух дней до нескольких недель (Spangenberg, 1967, 1971; Kuniyoshi et al., 2012; Fuchs et al., 2014; Cabrales-Arellano et al., 2017; Wang, 2017). Одно из таких веществ – 5-метокси-2-метилиндол.

Как было указано выше, индукция стробилиации за счет вариации естественных факторов среды (снижение температуры содержания) требует значительного времени и результат остается достаточно непредсказуемым. Поэтому в настоящей работе была поставлена цель провести сравнительный анализ процесса стробилиации и разнообразия отклонений во внешней морфологии эфир при химической индукции стробилиации. Описано и классифицировано значительное число отклонений, в том числе ранее не описанных, в строении эфир, сформировавшихся в процессе стробилиации клональных полипов *A. aurita* из Черного моря, индуцированных растворами 5-метокси-2-метилиндола различных концентраций от 5 нМ до 5 мМ.

Полученные данные свидетельствуют об определенном влиянии химического индуктора на процесс стробилиации. Это позволит в дальнейшем провести анализ закономерностей отклонений, наблюдающихся у различных представителей сцифоидных как при развитии в естественных условиях, так и при химической индукции стробилиации полипов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении экспериментов использовали полипов *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) из клональной культуры, полученной от полипов из Черного моря (рис. 1). Культура состоит из потомков одного полипа, видовая принадлежность которого подтверждена молекулярно-филогенетическим анализом, проведенным по генам *CO1* и *28S*, с использованием последовательностей из Генбанка (Бондарь, 2019). Использование генетически однородных полипов исключает влияние генетических различий на результаты экспериментов. Культура содержится на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова при постоянных условиях при 18°C, в искусственной морской воде (Coral Pro, Red Sea, Израиль) соленостью 18 промилле. Кормление полипов осуществляется науплиусами *Artemia* sp. два раза в неделю. Культура, а также все полипы во время проведения экспериментов содержались в темной комнате. Полипы этой культуры никогда не приступали к спонтанной стробилиации.

### Индукция стробилиации

В экспериментах по индукции использовали полипов примерно равных размеров, так как известно, что количество эфир (но не их размер) и время стробилиации зависят от размеров полипа (Kroiher et al., 2000). Эксперименты начинали не ранее, чем через сутки после последнего кормления. В течение эксперимента полипов не кормили. Для индукции по 5 полипов помещали в пластиковые емкости с 10 мл искусственной морской воды с индуктором заданной концентрации. Воду с индуктором не меняли.

Были проведены четыре серии экспериментов с различными концентрациями индуктора 5-метокси-2-метилиндола (#M15451, Sigma-Aldrich) (далее – индола): 5 нМ, 25 нМ, 1 мкМ, 5 мкМ. Минимальная и максимальная концентрации индуктора в 5 нМ и 5 мкМ были выбраны исходя из данных, приведенных в работе Фучса с соавт. (Fuchs et al., 2014), где было показано, что эти концентрации вызывают 100%-ю стробилиацию индуцированных полипов *A. aurita* линии “Роскоф” в течение 48–96 ч.

Наблюдение за ходом стробилиации одновременно проводили после индукции индолом в од-

ной емкости с 5-ю полипами для каждой из указанных концентраций. Все эксперименты проведены в трехкратной повторности. Первая повторность была проведена отдельно. Вторая и третья повторности эксперимента — после завершения первой повторности и практически одновременно (параллельно) — с разницей в один день. Таким образом, в каждой серии экспериментов с определенной концентрацией индуктора было использовано 15 полипов (три повтора по одной емкости с 5-ю полипами), и всего в 4-х сериях — 60 полипов, которые дали начало 640 эфирам.

Для получения заданной концентрации индуктора использовали маточный раствор концентрацией 50 мМ, приготовленный на ДМСО (DMSO — диметилсульфоксид) (#D8418, Sigma-Aldrich). Как показали предварительные эксперименты, ДМСО в максимальной конечной концентрации 0.01% не оказывает влияние на функционирование и жизнеспособность полипов: интенсивность бесполого размножения в контроле и в эксперименте (с добавлением 0.01% ДМСО) в течение 14 дней не отличалась. Полипы находились в растворе индуктора до стадии средней стробилы (когда цвет верхних зачатков эфир изменялся на красный) — в среднем 11–12 дней. Как правило, все пять полипов, индуцированных в одной группе, развивались с одинаковой скоростью и, соответственно, достигали стадии средней стробилы одновременно. В некоторых случаях скорость развития стробилы в одной группе отличалась. В таких случаях промывку и перенос полипов осуществляли, ориентируясь на время перехода к стадии средней стробилы первого полипа в группе. По достижении этой стадии, стробилы после трехкратной отмывки в 30 мл чистой морской воды переносили по одной в емкости с чистой искусственной морской водой до завершения отделения эфир.

#### *Регистрация*

Наблюдение за процессом стробилиации проводили ежедневно один раз в день. Поэтому полученные данные соответствуют “моментальному” состоянию полипов в момент изучения. Если количественные признаки между пятью полипами в одной емкости различались, то приводятся лимиты разброса этих признаков.

Наблюдение и съемку стробил и эфир проводили под бинокляром МСП-1 (АО ЛОМО, Россия), оборудованным цифровой окулярной камерой DCM310 (Shangrao TeleView Optical Instruments, China) с использованием программного обеспечения ScorePhoto V. 3.1. Обработку изображений проводили в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc.). Коррекция яркости, контраста осуществлялась применительно ко всему изображению.

При подсчете встречаемости отклонений в строении эфир, каждый из выделенных признаков учитывался один раз для каждой особи, даже если у нее данный признак повторялся. Например, если у эфиры сформировались две лопасти без ропалиев, то признак “отсутствие ропалия на лопасти” учитывался один раз. В то же время, если у одной эфиры наблюдалось несколько разных отклонений, то каждое из них учитывалось независимо от наличия других отклонений.

#### *Сканирующая электронная микроскопия*

Для изучения методом сканирующей электронной микроскопии стробилы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буферном растворе (PBS). Перед фиксацией стробилы анестезировали в 3.5% растворе  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  в соотношении 1 : 1 с искусственной морской водой. После фиксации образцы постепенно обезвоживали в серии этанолов возрастающей концентрации и постепенно переводили в ацетон. Затем образцы высушивали в критической точке с помощью Hitachi Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Japan), напыляли золотом и платиной. Изучение проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan-S2 (Jeol, Japan). Система оцифровки изображений: АЦП LCard под управлением программы MicroCapture (ООО “СМА”).

#### *Статистическая обработка данных*

Статистический анализ проведен в программной среде R (R Core Team, 2021) с использованием базового пакета “Stats” ver. 4.1.1 (R Core Team, 2021). Для оценки различия в соотношении аномалий использовали критерий независимости  $\chi$ -квадрат (Chi-Square test of independence). Для оценки зависимости общего количества эфир и количество отклонений на эфиру от концентрации был проведен регрессионный анализ. Эксперименты проведены в трех повторностях, по пять особей в каждом повторе. Всего проанализировано 640 эфир и 1264 аномалии.

Часть расчетов на основании первичных количественных данных были обработаны в программе для работы с электронными таблицами Microsoft Excel (Microsoft).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении экспериментов по индукции стробилиации раствором индола полипов *Aurelia aurita* был выявлен ряд различий в процессе развития стробилиации, формирования эфир и последующего их отделения от материнских полипов при различных концентрациях использованного индуктора.

**Таблица 1.** Сравнение развития процесса стробилизации при разных концентрациях индуктора (С) в трех сериях экспериментов. Числа соответствуют числу зачатков эфир в соответствующий день (Т) с начала индукции. Перекрестие обозначает завершение процесса отделения эфир. к – с образованием конгломератов неразделяющихся эфир

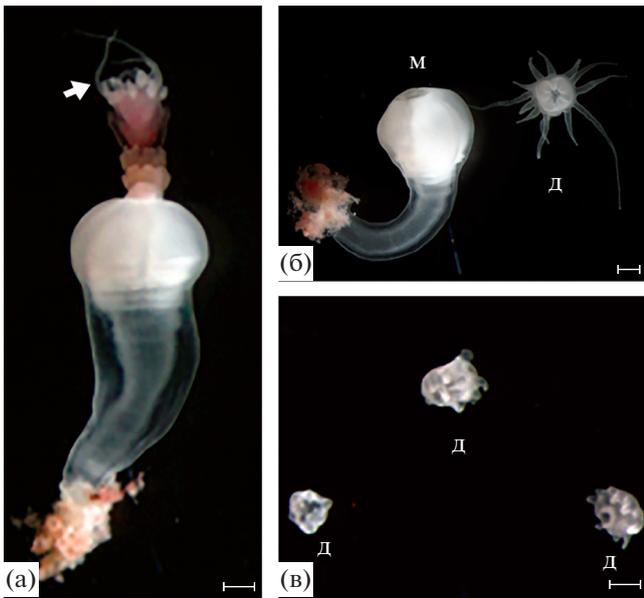
С	Т										
	1	3	4	5	10	19	20	22	24	26	27
5 нМ	0	0	1	1–2	5–7	10–12	10–12	✕			
	0	0	1	1–2	3–7	3–9	к	к	к	✕	
	0	0	1	1–2	3–7	5–11	к	к	к	к	✕
25 нМ	0	1	2	3–4	11–13	11–13	✕				
	0	1	2	3–4	11–13	11–13	14–16	14–16	✕		
	0	1	2	3–4	11–13	11–13	14–17	14–17	✕		
1 мкМ	0	1	2	3–4	13–14	✕					
	0	1	2	3–4	13–14	к	к	к	✕		
	0	1	2	3–4	13–14	к	к	к	✕		
5 мкМ	0	1	2	3–4	14–16	14–16	✕				
	0	1	2	3–4	14–16	14–16	к	✕			
	0	1	2	3–4	14–16	14–16	к	✕			

### *Процесс стробилизации*

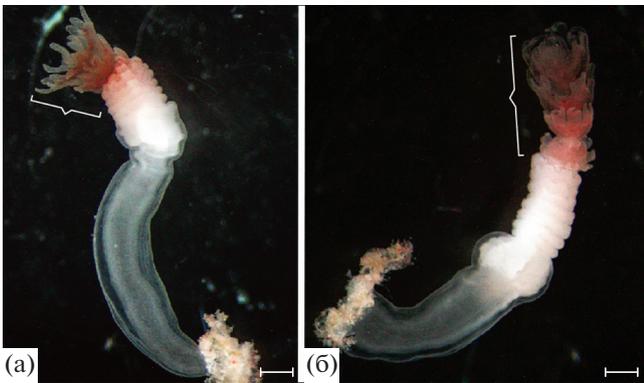
При индукции полипов растворами с минимальной концентрацией индуктора 5 нМ во всех повторностях экспериментов появление первых перетяжек – начало формирования зачатков эфир – наблюдали на четвертый день индукции. При повышении концентрации до 25 нМ–5 мкМ первая перетяжка закладывалась на третий день после начала индукции. Скорость закладки перетяжек, отделяющих последующие зачатки эфир, также различалась при изменении концентрации индуктора. На пятый день индукции у полипов, индуцированных растворами с концентрацией 5 нМ, формировались одна–две перетяжки; с концентрацией 25 нМ и выше – три–четыре перетяжки. На десятый день экспозиции отличие в скорости формирования зачатков эфир у поли-

пов, индуцированных раствором с концентрацией 5 нМ, и у полипов, индуцированных растворами с более высокими концентрациями индуктора, усиливается. Так, в первой повторности экспериментов на десятый день индукции при концентрации индуктора 5 нМ у стробил сформировалось 5–7 перетяжек, при 25 нМ – 11–13 перетяжек, при 1 мкМ – 13–14 перетяжек, и при концентрации 5 мкМ – 14–16 перетяжек (табл. 1).

Во второй и третьей повторности экспериментов скорость закладки перетяжек у полипов при индукции раствором концентрацией 5 нМ была несколько ниже. На 10 день индукции при этой концентрации разброс в количестве перетяжек у разных полипов увеличился и составил от 3 до 7. При остальных концентрациях индуктора число формируемых у полипов перетяжек во второй и



**Рис. 3.** Результат незавершенной стробилиации и отделения недоразвитых зачатков эфир от стробилы при индукции стробилиации 5 нМ 5-метокси-2-метилиндолом в третьем повторе эксперимента. (а) Начало формирования стробилы; стрелкой обозначена оральная часть стробилы с зачатками эфир; красноватые ткани верхней эфир преобразуются в белые ткани полипа. (б) Материнский и дочерний полип, образовавшийся из зачатка эфир. (в) дочерние полипы, образовавшиеся из зачатков эфир, отделившихся от стробилы. д – дочерние полипы, образовавшиеся в результате отделения зачатков эфир, м – материнский полип. Длина масштабной линейки – 1 мм.



**Рис. 4.** Варианты развития стробил, индуцированных раствором с концентрацией 5 нМ 5-метокси-2-метилиндола во второй и третьей серии экспериментов. Часть эфир, расположенные ближе к оральной части полипа, развиваются быстрее, в то время как зачатки эфир, расположенные ближе к аборальной части тела полипа, развиваются с существенной задержкой. Скобками обозначены эфир, находящиеся на поздних стадиях развития. Длина масштабной линейки – 1 мм.

третьей серии экспериментов осталось таким же, как и в первой повторности эксперимента.

Стоит отметить, что при проведении второй и третьей повторностей экспериментов при индук-

ции раствором индола 5 нМ один из десяти полипов не приступил к стробилиации. Еще три полипа приступили к стробилиации, но формирование эфир приостановилось до перехода на стадию средней стробилы (после формирования первых 3–4 перетяжек), то есть до начала формирования зачатков лопастей эфир и изменения цвета тканей. В итоге сформировавшиеся зачатки эфир отделились от указанных трех материнских полипов и трансформировались в дочерние полипы, которые сформировали щупальца и манубриумы (рис. 3). У остальных шести полипов переход к стадии средней стробилы растянулся от 13 до 15/16 сут с момента начала индукции. При этом у двух полипов наблюдали ситуацию, когда зачатки 3–5 первых эфир, сформированные на начальных стадиях стробилиации, дифференцировались гораздо быстрее, чем последующие зачатки. В результате стробила выглядела подразделенной на 2 части (рис. 4). Проксимальные зачатки в дальнейшем дифференцировались в эфир с существенной задержкой.

На одиннадцатый день все полипы, индуцированные с помощью растворов с концентрациями от 25 нМ и выше, а также полипы, индуцированные с помощью раствора с концентрацией 5 нМ в первой серии экспериментов, достигли стадии средней стробилы: у верхних зачатков эфир начинали формироваться лопасти, ткани зачатков приобретали красно-оранжевый оттенок. Полипы, индуцированные раствором 5 нМ во второй и третьей серии экспериментов, развивались медленнее, оставаясь на 11-й день на стадии ранней стробилы. Стадии средней стробилы полипы при этой концентрации индуктора достигали на 13–15/16 день. Развитие зачатков эфир происходило по очереди, с сохранением тенденции орально-аборального направления развития стробилы. Полностью сформированные верхние эфир отделялись от материнской особи еще до окончательного развития эфир, расположенных ближе к аборальной части тела стробилы.

Завершением стробилиации считалось отделение последней эфир от материнской особи. В первой повторности экспериментов при индукции раствором концентрации 5 нМ стробилиация завершилась на 22 день, при концентрациях 25 нМ, 1 мкМ и 5 мкМ – на 19–20 день (табл. 1). В последующих двух повторностях экспериментов шесть полипов, индуцированные раствором с концентрацией 5 нМ, завершили процесс отделения эфир на 26–27 день, а полипы, индуцированные раствором с концентрацией индуктора 25 нМ и 1 мкМ – на 24 день, 5 мкМ – на 22 день.

При самой низкой концентрации индуктора (5 нМ) отмечено наименьшее среднее число отделившихся эфир во всех повторях –  $35.3 \pm 16.17$  эфир. При более высоких использованных кон-

центрациях общее число сформированных и отделившихся эфир почти в два раза выше: при концентрации индуктора в 25 нМ в среднем было сформировано  $59.3 \pm 2.89$  эфиры, при 1 мкМ –  $63.6 \pm 11.59$  эфиры, и при 5 мкМ –  $55 \pm 8.89$  эфиры. Однако, проведенный анализ показал отсутствие значимой зависимости общего числа эфир от используемой концентрации ( $p = 0.617$ ) (рис. 5).

### Эфиры

Во всех проведенных экспериментах при всех концентрациях индуктора наблюдалось формирование эфир с отклонениями от нормы. Доля эфир с теми или иными отклонениями, сформированных при индукции растворами различных концентраций, варьировала от 86 до 100%. Проанализировав строение эфир, полученных в результате химической индукции стробилиации в настоящих экспериментах, мы выделили 17 различных отклонений во внешней морфологии отделившихся эфир (рис. 6):

- 1 – количество лопастей превышает 8;
- 2 – количество лопастей меньше 8;
- 3 – отсутствует ропалий на лопасти;
- 4 – два ропалия на одной лопасти, расположенные рядом друг с другом;
- 5 – лопасть с дополнительной, третьей краевой лопастью, расположенной между ее основными краевыми лопастями; данное отклонение мы разделили на три варианта: по двум сторонам от дополнительной краевой лопасти формируется два (5.2), один (5.1) либо ни одного ропалия (5.0);
- 6 – лопасть с дополнительной краевой лопастью, раздвоенной на конце, и расположенной между ее основными краевыми лопастями; в данном случае мы так же выделили три варианта: по двум сторонам от дополнительной раздвоенной краевой лопасти формируется два (6.2), один (6.1) либо ни одного (6.0) ропалия;
- 7 – сдвоенная лопасть меньшего размера, с ропалиями или без них;
- 8 – недоразвитая лопасть (меньшего размера) с ропалием или без него; как правило, такая лопасть лишена одной из краевых лопастей и имеет неправильную форму;
- 9 – основание недоразвитой лопасти: широкое короткое образование между двумя лопастями, без ропалиев и краевых лопастей; такая структура напоминает “оплавленные” лопасти, которые иногда упоминаются в литературе;
- 10 – длинный тонкий отросток между лопастями эфиры; данное образование имеет форму тонкого вытянутого конуса и не имеет ропалия или расширения на конце, в котором мог бы располагаться ропалий.

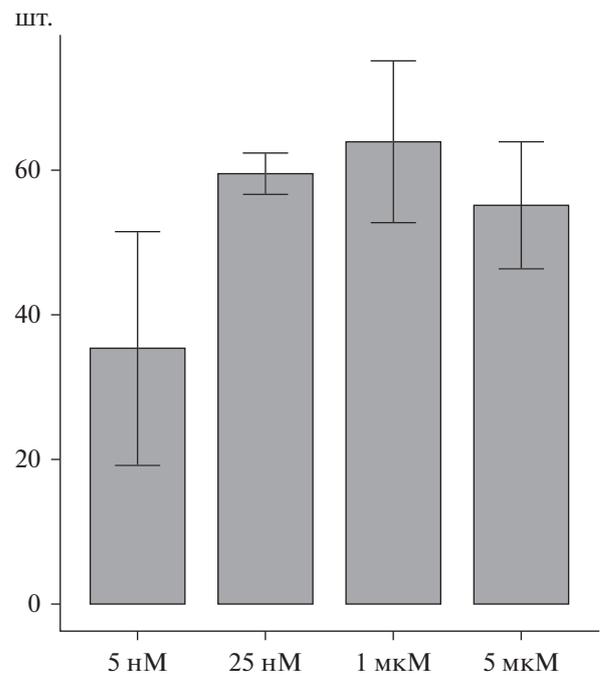


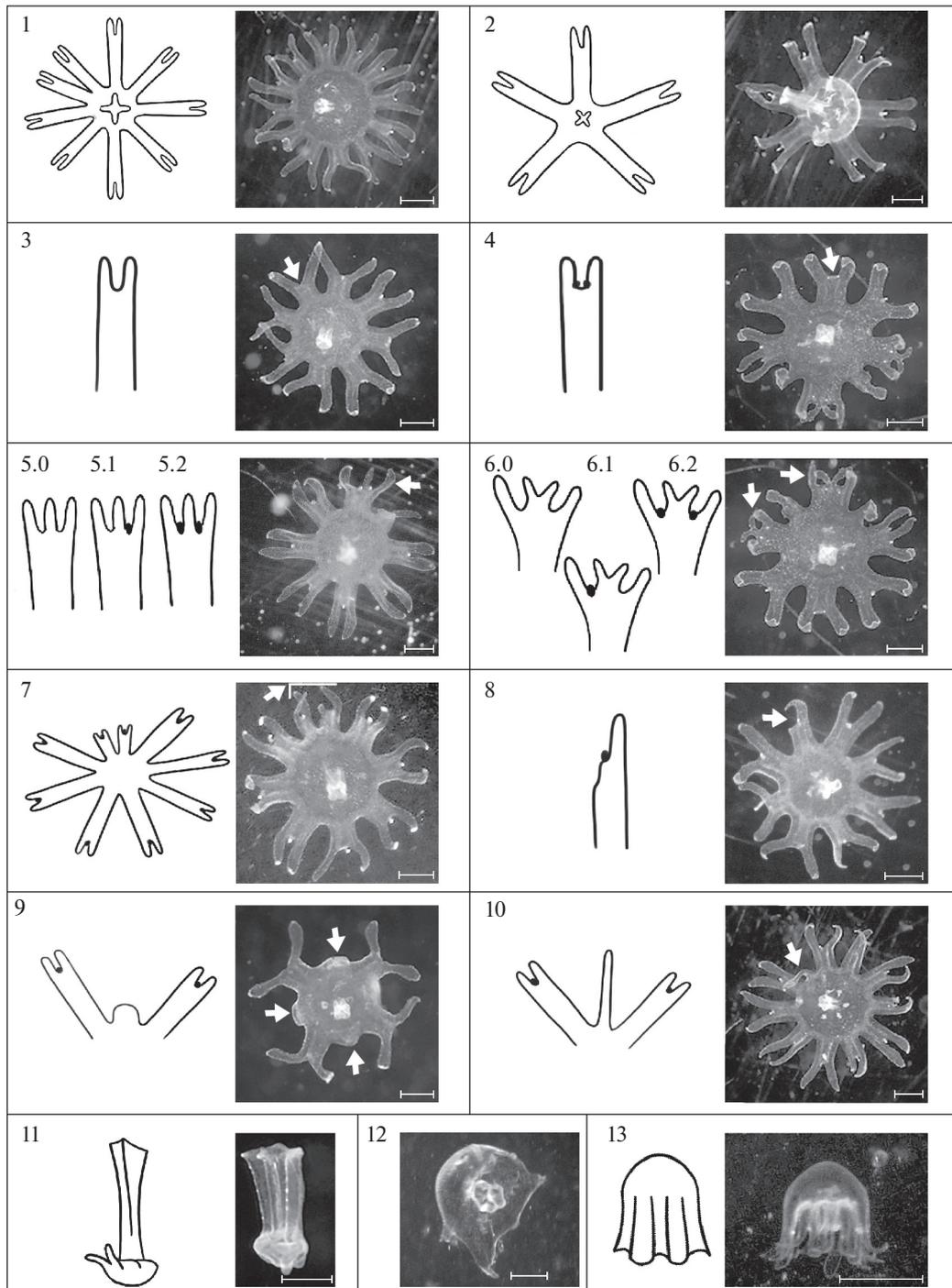
Рис. 5. Сравнение среднего числа отделившихся эфир (по оси ординат, шт.) во всех повторностях эксперимента в зависимости от концентрации индуктора (по оси абсцисс). Средние значения представлены с учетом стандартного отклонения.

Вышеперечисленные отклонения, судя по всему, не могут служить препятствием к дальнейшему развитию эфир, в соответствии с наблюдениями Брауне (Browne, 1895), который утверждал, что изменение числа ропалиев и числа лопастей у эфир не мешает им благополучно вырастать во взрослых медуз. Поэтому эфиры с вышеперечисленными отклонениями (№№ 1–10) рассматривались нами как “жизнеспособные”.

Еще три наблюдавшихся отклонения в строении эфир выделяются среди остальных, поскольку существенно изменяли общий вид эфир. Такие отклонения мы рассматривали как летальные, делающие невозможным дальнейшее развитие эфир:

- 11 – эфира-манубриум: личинка, не имеющая ни одной лопасти, состоящая только из манубриума, слепо заканчивающегося зачатком зонтика;
- 12 – бесформенная эфира: “комочек” тканей, не имеющий сколько-нибудь оформленных лопастей или манубриума;
- 13 – эфира, постоянно находящаяся в “сжатом” состоянии; такие эфиры не сокращались и не передвигались в толще воды.

Другие наблюдавшиеся отклонения от нормы при индукции стробилиации индолем выражались в нарушении процесса отделения эфир от материнского полипа. Такие нарушения стробилиации можно рассматривать и как вариант отклонения в



**Рис. 6.** Отклонения в строении эфир, сформировавшихся в результате индукции стробилиции *Aurelia aurita* растворами 5-метокси-2-метилиндола различных концентраций. Цифры на рисунке соответствуют отклонениям в списке, приведенном в тексте. 1 – эфир с увеличенным количеством лопастей; 2 – эфир с уменьшенным количеством лопастей; 3 – эфир с лопастями, на которых отсутствуют ропалии; 4 – эфир с лопастью, на которой располагается два ропалия; 5.0, 5.1, 5.2 – эфир с лопастью с дополнительной, третьей краевой лопастью, расположенной между ее основными краевыми лопастями; данное отклонение разделяется на три типа: без ропалиев, с одним ропалием, с двумя ропалиями; 6.0, 6.1, 6.2 – эфир с лопастью с дополнительной краевой лопастью, раздвоенной на конце; данное отклонение так же разделено на три типа: без ропалиев, с одним ропалием, с двумя ропалиями; 7 – двояная лопасть меньшего размера с ропалиями или без них; 8 – недоразвитая лопасть (меньшего размера), с ропалием или без него; 9 – основание недоразвитой лопасти: широкое короткое образование между двумя лопастями; 10 – длинный тонкий отросток между лопастями эфир; 11 – манубриум, то есть эфир без лопастей (летальное отклонение); 12 – бесформенная эфир (летальное отклонение); 13 – эфир, постоянно находящаяся в “сжатом” состоянии (летальное отклонение). Стрелками на фотографиях указаны отклонения, соответствующие изображенным на схеме. Масштабная линейка – 1 мм.

строении эфир, однако точно определить варианты отклонений в строении самих эфир затруднительно. Все обнаруженные нарушения процесса стробилиации мы разделили на три варианта (рис. 6):

1от — от материнской особи отделялась группа эфир; четких границ между отдельными эфирами определить невозможно; такие эфиры не разделялись в дальнейшем и имели неправильное строение; некоторые полипы давали начало нескольким группам эфир, не отделившихся друг от друга;

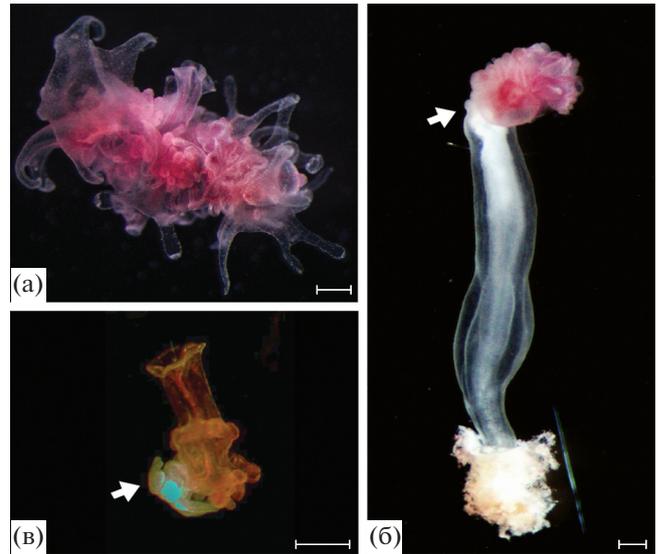
2от — последняя сформировавшаяся на стробиле эфира (т.е., расположенная ближе всего к аборальному концу тела полипа) не отделялась от материнского полипа;

3от — последняя сформировавшаяся на стробиле эфира отделялась от материнского полипа вместе с частью тканей формирующейся оральной части тела полипа.

Нарушение в виде последней эфиры, которая не отделяется от материнского полипа, встречалось чаще при повышении концентрации индуктора. Так, при индукции раствором с концентрацией 5 нМ в среднем 26.6% полипов не отделяли последнюю эфиру, однако с повышением концентрации индола доля таких полипов возрастала и составляла 60, 66.6 и 86% при индукции растворами 25 нМ, 1 мкМ и 5 мкМ соответственно. Также при повышении концентрации индуктора с 5–25 нМ до 1–5 мкМ доля стробил, которые отделяли конгломераты эфир, возрастала с 13 до 53–66.6%. Эфиры, отделявшиеся вместе с частью тканей оральной части тела полипа, встречались только при индукции раствором с концентрацией 1 мкМ, и доля полипов с таким отклонением составила 20%.

Отделение группы эфир от материнской особи наблюдалось только во второй и третьей повторностях экспериментов, причем подобные конгломераты формировались во всех группах вне зависимости от концентрации индуктора в воде (рис. 7а). Такие конгломераты всегда формировались либо в самой нижней части стробилы, либо перед несколькими самыми аборальными зачатками эфир.

Во всех экспериментах наиболее часто встречающимся отклонением было отсутствие ропаля на лопасти (№ 3). Общее количество эфир с данным отклонением при различных концентрациях индуктора составило от 54 до 68.6% от всех эфир. Другими наиболее часто встречаемыми “жизнеспособными” отклонениями были меньшее количество лопастей (№ 2) и недоразвитые лопасти (№ 8) — от 21.76 до 46% и от 42.92 до 53.83% соответственно (рис. 8). Интересно, что увеличение числа лопастей наблюдалось редко. Вместе с тем начавшееся, но незавершенное развитие лопасти (№ 9), и лопасть измененной формы в виде тонкого выроста (№ 10), встречались



**Рис. 7.** Нарушения процесса отделения эфир от стробилы. (а) Отделение группы эфир, которые в последующем не отделяются друг от друга; (б) стробила, не отделившая последнюю эфиру; (в) эфира, отделившаяся от материнского полипа с частью тканей оральной части тела материнской особи. Стрелками указаны оральные части тела материнского полипа. Масштабная линейка — 1 мм.

достаточно часто. Остальные варианты отклонений, не приводящих к резкому снижению жизнеспособности эфир, встречались крайне редко.

Результат проведенного анализа показал, что доля наиболее часто встречающихся типов отклонений (№№ 2, 3, 8 и 9) значимо различается при использовании различных концентраций индуктора ( $\chi^2 = 39.564, p < 0.01$ ) (рис. 9). Наибольший вклад в формирование различных демонстрирует распределение долей при концентрации 5 нМ, при которой доля нормальных эфир и эфир с отклонением № 9 значимо больше, а доля эфир с отклонением № 2 — значимо меньше, чем при остальных используемых концентрациях. При этом три остальные концентрации по соотношению долей данных типов отклонений между собой не различаются ( $\chi^2 = 7.15, p = 0.52$ ).

Анализ распределения частот отклонений по параметру жизнеспособности дал похожие результаты: при концентрации индуктора в 5 нМ наблюдалось значимо больше нормальных эфир и меньше эфир с нежизнеспособными отклонениями ( $\chi^2 = 39.092, p < 0.01$ ), тогда как доля наблюдавшихся эфир с жизнеспособными отклонениями при всех использованных концентрациях индуктора оказалась сходной (рис. 10). В каждой серии экспериментов наблюдали некоторое увеличение доли эфир с летальными отклонениями (отклонения №№ 11–13) при повышении кон-

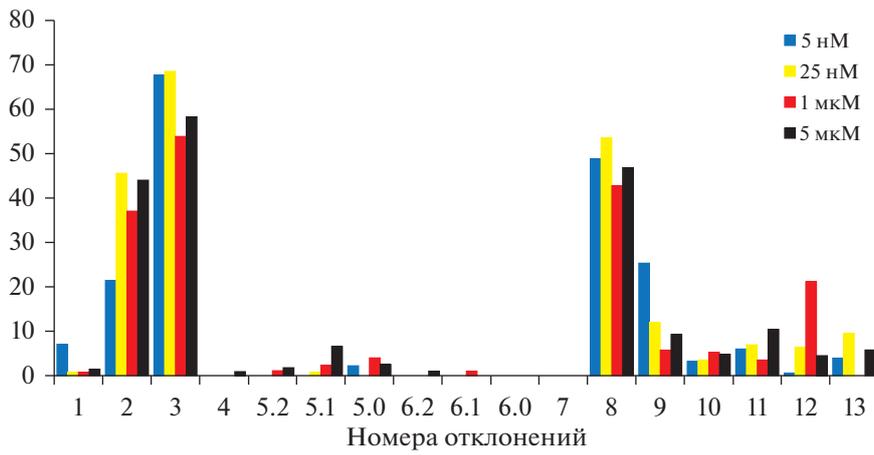


Рис. 8. Средняя частота встречаемости тех или иных отклонений (по оси абсцисс — номера отклонений) в строении эфир и в отделении эфир от стробилы при различных концентрациях индуктора.

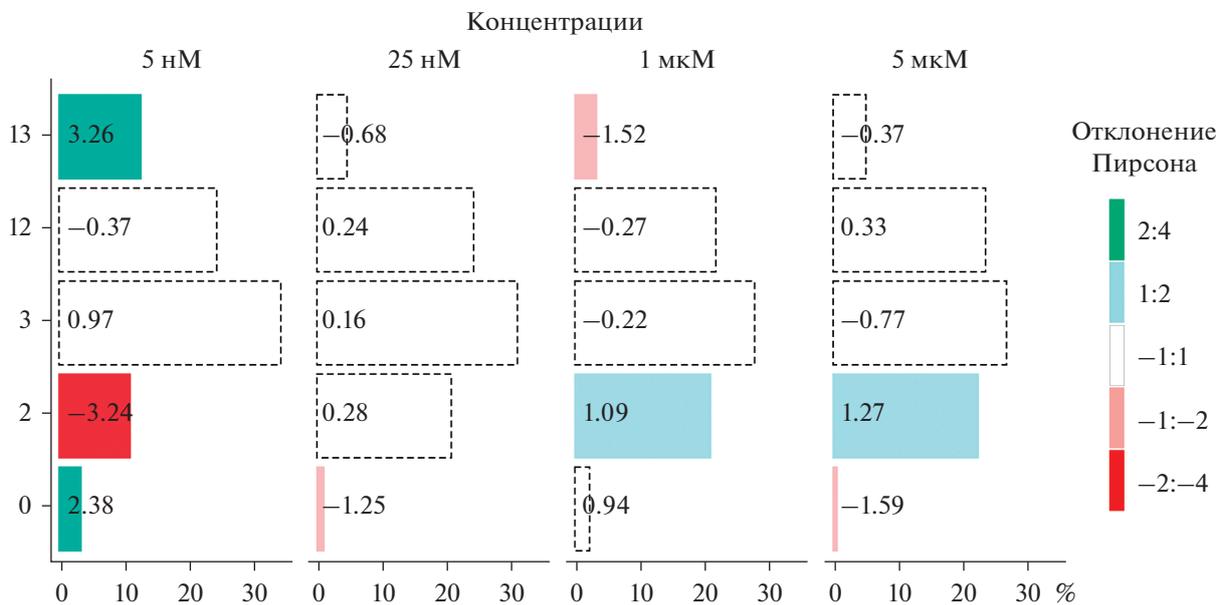


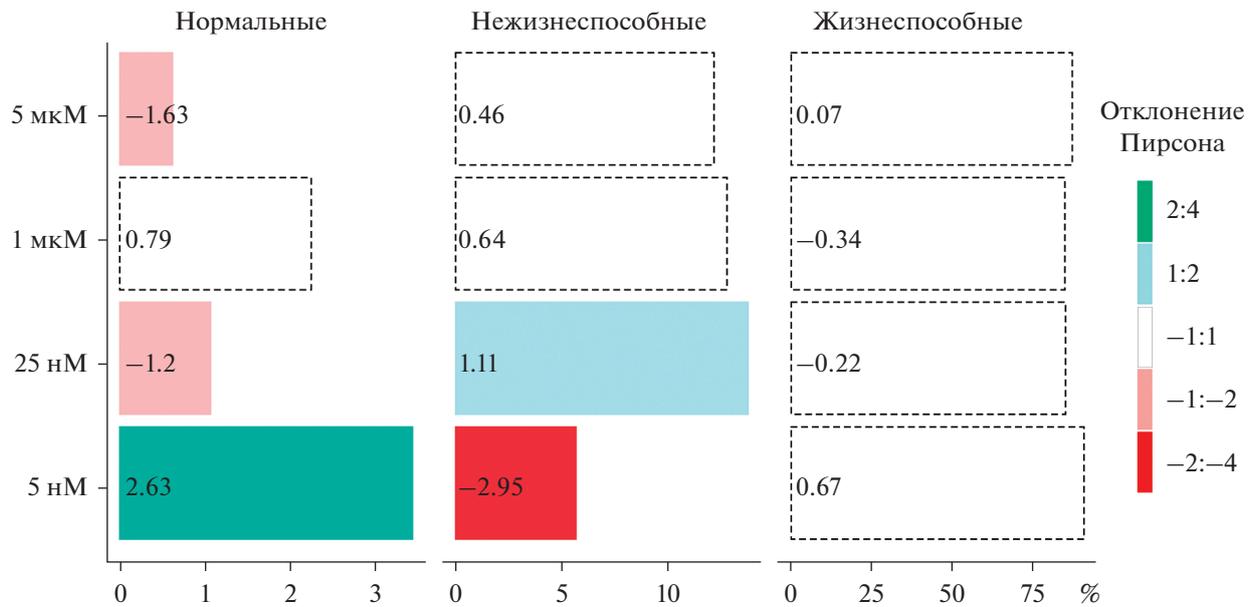
Рис. 9. Распределение соотношений наиболее часто встреченных отклонений в строении эфир в зависимости от концентрации индуктора. По оси абсцисс — средняя доля данного отклонения (показана высотой столбика) в общем пуле отклонений для данной концентрации. По оси ординат — номера отклонений (0 — норма). Цветом выделены значения отклонений от ожидаемого распределения.

центрации индуктора, однако разница была статистически недостоверна (рис. 11).

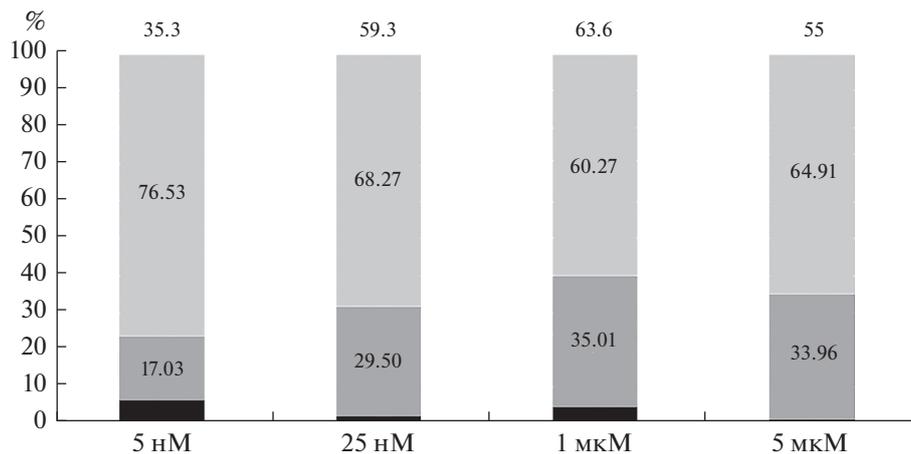
В большинстве случаев у одной эфир одновременно наблюдали более одного отклонения, но среднее количество аномалий на эфире для всех концентраций индуктора значимо не отличалось ( $p = 0.669$ ) и близко к двум (рис. 12). Среди жизнеспособных эфир с отклонениями чаще в среднем наблюдали  $2.60 \pm 0.306$  отклонения эфире-1, что также не зависело от концентрации индуктора.

*Отклонения, заметные до начала отделения эфир от материнского полипа*

Внимательное наблюдение за процессом стробилизации показало, что нарушения формирования зачатков эфир становятся заметными уже на стадии средней стробилы, в тот момент, когда начинается формирование лопастей будущих эфир. Нарушения возникали независимо в разных частях стробилы, и у разных особей они носили индивидуальный характер. На рис. 13 видно, что за-



**Рис. 10.** Распределение долей нормальных эфир, суммы долей эфир с нежизнеспособными отклонениями и суммы долей эфир с жизнеспособными в зависимости от концентрации индуктора. По оси абсцисс — доля данных отклонений (показана высотой столбика) в общем пуле отклонений для данной концентрации. По оси ординат — концентрации индуктора. Цветом выделены значения отклонений от ожидаемого распределения.



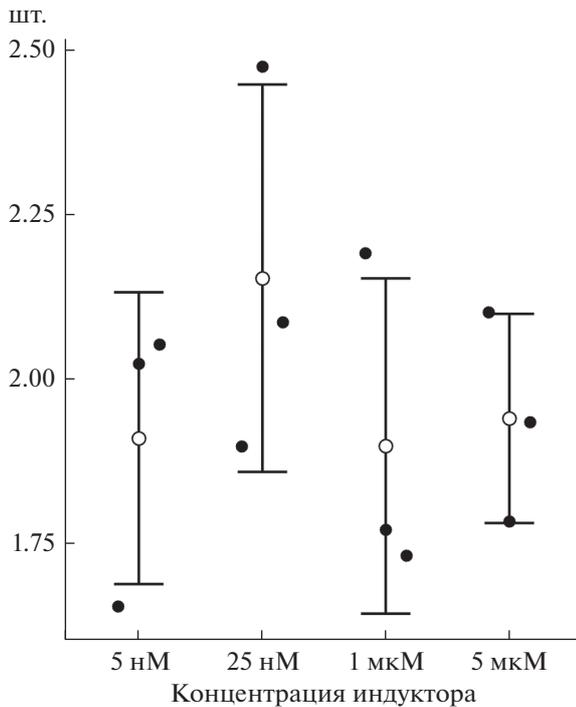
**Рис. 11.** Соотношение долей (среднее значение по трем повторностям) эфир с нормальным строением (■), эфир с отклонениями (■) и нежизнеспособных эфир (с летальными отклонениями) (■) при индукции стробилиации различными концентрациями 5-метокси-2-метилиндола. Цифрами над столбиками указано среднее число сформированных эфир в данной группе эксперимента.

чатки эфир хаотично покрыты глубокими бороздами, придающими им неправильную форму.

## ОБСУЖДЕНИЕ

“Естественная” индукция стробилиации *Aurelia aurita* требует продолжительного снижения температуры, не дает 100%-ый результат, и стробилиация полипов начинается не одновременно (Fuchs et al., 2014; Сухопутова, Краус, 2017). Поэтому в

большинстве работ, посвященных вопросам регуляции жизненного цикла *A. aurita*, применяют индукцию с использованием различных концентраций 5-метокси-2-метилиндола, которые варьируют от 0.1 нМ до 50 мМ (Kuniyoshi et al., 2012; Helm, Dunn, 2017; Wang, 2017; Yamamori et al., 2017), что вызывает почти 100%-ю стробилиацию в течение 1–2-х дней (Kuniyoshi et al., 2012; Helm, Dunn, 2017; Wang, 2017; Yamamori et al., 2017). Однако практически ничего не известно о возмож-



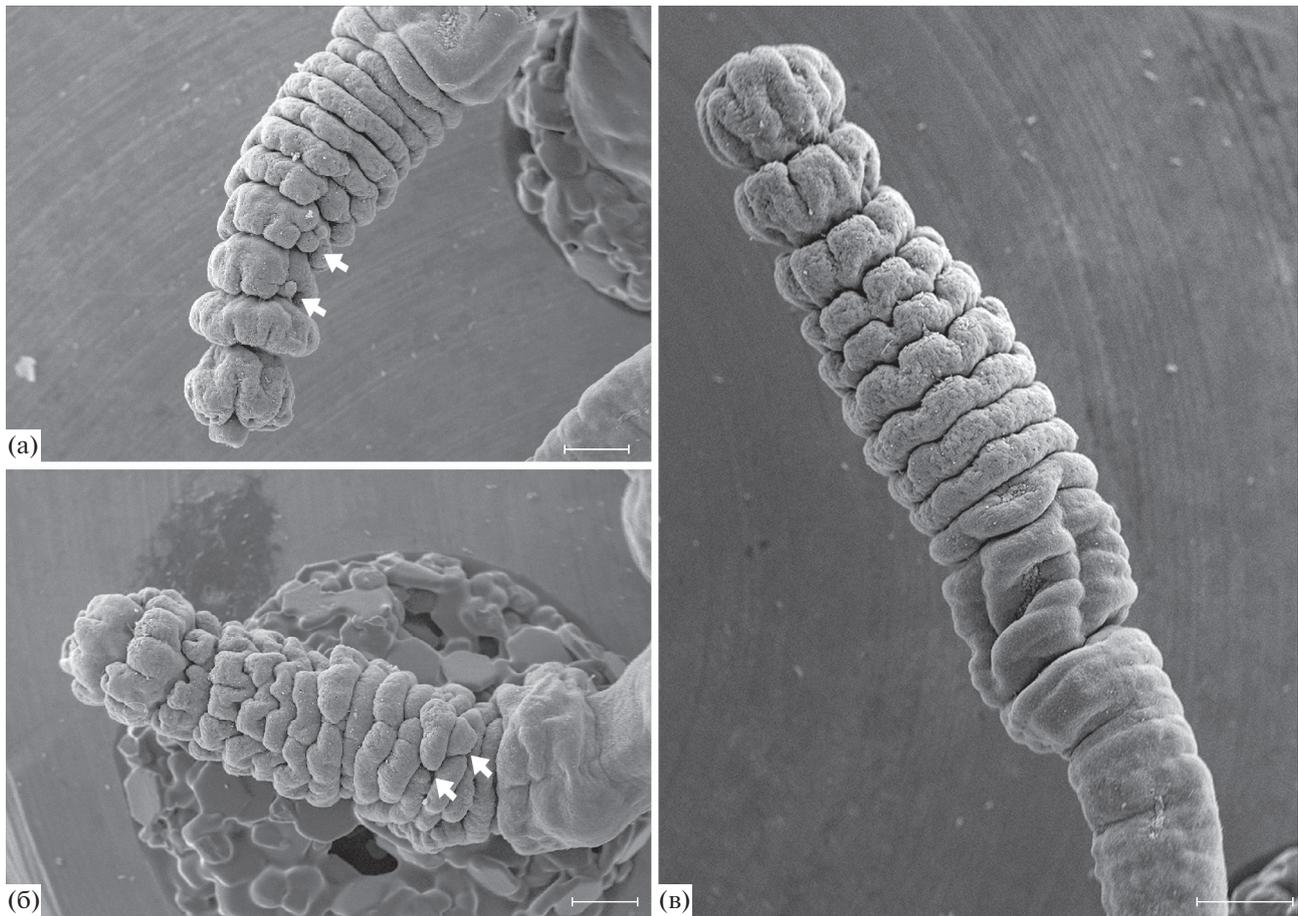
**Рис. 12.** Сравнение количества отклонений на одну эфир (по оси ординат, шт.) в зависимости от концентрации индуктора (по оси абсцисс). Светлые кружки – среднее значение по всем повторностям, черные кружки – среднее значение для каждой повторности, значения приведены с учетом стандартного отклонения.

ном влиянии данного индуктора на морфологию формирующихся эфир. В литературе также практически отсутствуют упоминания о возможном изменении процесса стробилиации при использовании химических индукторов. Лишь в одной работе указано, что при продолжительной инкубации полипов *A. aurita* в растворе 5-метокси-2-метилиндола стробилиация не останавливалась вплоть до полного подразделения тканей на зачатки эфир, которые на завершающей стадии имели неправильное строение из-за нехватки тканей. В этой же работе также указано, что у представителей подкласса Коронамедуз (Corynemedusae) 5-метокси-2-метилиндол вызывает стрессовую реакцию без последующего развития стробилы, а у некоторых представителей класса Кубомедуз (Cubozoa) высокие концентрации индуктора приводят к формированию эфир неправильного строения, что может свидетельствовать о токсическом воздействии 5-метокси-2-метилиндола (Helm, Dunn, 2017).

Как и сам процесс стробилиации в лабораторных условиях (Custance, 1964; Verking et al., 2005; Holst, 2012), воздействие индола как индуктора оказывается очень вариабельным и зависит от множества “неизвестных” факторов – индивидуально-

го полипа, времени, температуры и т.п. Вполне возможно, что существенные отличия в частоте наблюдаемых отклонений от нормы в строении эфир и в самом процессе стробилиации при индукции индолем, выявленные в нашей работе, и в работе Хелм и Дана (Helm, Dunn, 2017), объясняются разным происхождением культур полипов. В нашей работе использована культура полипов, происходящая из Черного моря, содержащаяся в морской воде соленостью 18 промилле, в то время как в работе Хелм и Дана использована южно-японская культура, содержащаяся в морской воде соленостью 35 промилле в университете г. Гамбурга. Другие известные работы, в которых использовали химическую индукцию стробилиации с применением 5-метокси-2-метилиндола, и в которых не было упоминаний о его токсическом влиянии, также проводили преимущественно на культурах *A. aurita*, полученных из разных мест. На культуре *A. aurita* из Роскофа была показана способность индола индуцировать стробилиацию с одинаковой вероятностью в диапазоне концентраций от 5 нМ до 50 мкМ (Fuchs et al., 2014; Wang, 2017). Не были отмечены отклонения в строении эфир и в работе с культурой полипов, полученных из Аквариума “Берч” (Сан-Диего, Калифорния) (Gold et al., 2019), и отнесенных к виду *Aurelia* sp. 1 (на самом деле более близкому к виду *A. limbata* (Dawson, Jacobs, 2001; Dawson, 2003)). Индукцию стробилиации индолем использовали в работе по анализу транскриптомов различных стадий жизненного цикла культуры *Aurelia*, происходящей от полипов, собранных в бухте города Киль (Германия), Балтийское море (Khalturin et al., 2019). В этой же работе был отмечен высокий уровень генетического разнообразия внутри рода *Aurelia* по всему миру.

Полученные в настоящем исследовании данные об отклонениях в морфологии эфир *A. aurita* сложно сравнивать с имеющимися немногочисленными литературными данными. Каждый из исследователей анализировал отдельный определенный вариант наблюдаемых отклонений. В одном случае – это было отклонение в числе ропалиев и лопастей у эфир и числе ропалиев у молодых медуз от типичных восьми, проанализированное на двух больших выборках эфир в 359 и 1116 экземпляров, и двух выборках медуз в 383 и 3000 экземпляров (Browne, 1895, 1901). Сходные данные о вариациях в числе лопастей у эфир других авторов упоминаются в работе Беррилла (Berrill, 1949). Отклонения в строении лопастей эфир направленно не изучались, но есть отдельные упоминания об этом в работах Харгитта (Hargitt, 1901), и рисунки некоторых обнаруженных отклонений приводятся в работе Гершвин, где были проанализированы отклонения от 4-х-мерной симметрии на выборке эфир в 227 экземпляров, полученных в лаборатории, и 4-х выборках взрослых



**Рис. 13.** Стробилы на стадии закладки лопастей эфир. СЭМ. (а, б) Разные стробилы на стадии средней стробилы с заметными отклонениями. (в) Стробила на стадии средней стробилы без заметных отклонений (норма). Стрелками указаны нарушения закладки лопастей, проявляющиеся в разных частях стробилы. Масштабная линейка – 0.3 мм.

медуз из 4-х разных географических мест сбора объемом в 386, 108, 501 и 241 экземпляр (Gershwin, 1999).

Сравнение показывает, что из описанных в настоящей работе отклонений в строении эфир в литературных данных есть указания на отклонения №№ 1, 2, 3, 4, 5.2 и 7 (уменьшение или увеличение числа ропалиев и лопастей у эфир, сдвоенные лопасти). Из этого можно сделать два вывода. Первый – отмеченные отклонения в строении эфир относятся к разряду отклонений, существенно не влияющих на “жизнеспособность” эфир. Соответствующие им отклонения в числе ропалиев обнаруживаются в естественных условиях и у медуз старшего возраста. Второй – появление данных отклонений не связано с химической индукцией, так как наблюдается и при естественной индукции стробилиации. Однако частота встречаемости указанных отклонений существенно различается в результатах наших лабораторных исследований (химическая индукция стробилиации), и в природных популяциях (естественная индукция стробилиации).

Так, в природной популяции в окрестностях Плимут-Саунта (Англия) увеличение или уменьшение числа ропалиев встречается в среднем у 21% эфир *A. aurita*, при том, что 16.1% эфир имели больше восьми ропалиев (Browne, 1901). В настоящей работе чаще встречалось уменьшение числа ропалиев (рис. 8), а с учетом того, что уменьшение числа лопастей (при индукции различными концентрациями индола число эфир с числом лопастей менее восьми варьировало в пределах от 21.6 до 46%), так же значительно превалировало над увеличением числа лопастей (число эфир с увеличенным количеством лопастей ни разу не превысило 7.3%), доминирующим отклонением можно считать число ропалиев меньше восьми. Если согласиться с Брауне, что число ропалиев у эфир соответствует числу ропалиев у медузы (оно не увеличивается при росте медузы) (Browne, 1895), то результаты наших экспериментов принципиально отличаются от данных, полученных на материале из естественных условий (без учета естественной летальности в процессе последующего развития эфир).

Другие “жизнеспособные” отклонения, часть из которых редко встречалась в эксперименте (№№ 5 и 6 – разные варианты дополнительных разделений лопастей на дистальных концах), а часть – достаточно часто (№№ 8–11 – различные варианты “недоразвитости” лопастей у эфиры) (рис. 6 и 8) не были отмечены в природных популяциях. Одна из возможных причин – эти отклонения встречаются у эфир крайне редко, и в процессе развития медузы “исчезают”. Рост зонтика медузы *Aurelia* происходит за счет “зарастания” промежутков между лопастями (Uchida, Nagaо, 1963), поэтому подобные отклонения в строении лопастей просто сглаживаются, и могут “переходить” в разряд отклонений, связанных с числом и расположением ропалиев у медузы.

Еще две группы существенных отклонений в морфологии эфир, выявленные в настоящей работе при химической индукции стробилиации – это “нежизнеспособные” отклонения (№№ 11–13), и нарушение процесса стробилиации, приводящее к отделению “конгломератов” сросшихся зачатков эфир трех различных комбинаций (№№ 10т–3от). Первая из указанных групп, естественно, не может быть обнаружена в естественных популяциях, так как не ведет к дальнейшему развитию эфир. Случаи отклонений из второй группы – “конгломераты” сросшихся зачатков, в большинстве случаев также ведут к гибели зачатков. Но в некоторых случаях, на наш взгляд, такие “конгломераты” могут сохранять некоторое время жизнеспособность, и их развитие может приводить к появлению описанных в литературе “монстров”: эфир с дополнительными лопастями на верхней стороне эфиры (Browne, 1895) или эфир со спиральным краем зонтика (Vanpucsi, 1957).

Интересно, что отклонение в виде отделения от материнской особи группы эфир, которые не отделялись друг от друга в дальнейшем, было отмечено только у полипов во второй и третьей серии экспериментов. Существуют исследования, показывающие изменение реакции полипов *A. aurita* на температурную индукцию при изменении условий содержания культуры полипов (Сухопутова, Краус, 2017). Известно так же, что полипы во время стробилиации выделяют в воду вещества, способные оказывать влияние на протекание стробилиации других полипов. В разных лабораторных культурах полипов также отмечены случаи спонтанной стробилиации, а также изменения эффективности отработанных методов индукции стробилиации, которые не всегда удавалось связать с условиями содержания культур (см. обзор (Sukhoputova, Kraus, 2017)). В связи с этим можно предположить, что отличия результатов разных серий наших экспериментов могут быть следствием изменения физиологического состояния полипов вследствие изменения неконтролируемых факторов среды.

О зависимости влияния химической индукции стробилиации индолом от состояния полипов может свидетельствовать и полученный в данной работе факт, что результаты первой серии индукции отличаются от второй и третьей. Все серии экспериментов по индукции проводили последовательно, то есть в разное время. При этом между первой и второй повторами серий временной интервал был значительно более протяженным, в то время как второй и третий повторы серий были проведены практически одновременно. Как результат – различия в полученных данных между вторым и третьим повторами значительно меньше, чем между ними и первой серией. В первую очередь стоит отметить разницу в скорости развития стробилиации: во втором и третьем повторе экспериментов отделение эфир продолжилось во всех группах полипов на 2–5 дней дольше, чем в первой (табл. 1).

Более того, определенное значение в формировании эфир могут играть индивидуальные особенности отдельных полипов. Так, при индукции 1 мкМ раствором индола в первом повторе экспериментов полипы, индуцированные вместе в одной емкости, дали начало 18 эфирам с летальными отклонениями, 16 из которых оказались потомками одной стробилы. Эти данные в определенной степени подтверждают ранее высказанное предположение, что соседние полипы одного клона могут стробилировать одновременно рядом с разной и независимой степенью вариабельности (Gershwin, 1999). В этой же работе приводится пример того, что клональная культура из одного родительского организма показывала повышенную вариабельность. В своей работе Гершвин приводит данные, свидетельствующие о возможном влиянии “генетической компоненты” на вариабельность строения эфир и медуз: разброс вариабельности не одинаков в разных географических популяциях *A. aurita* (Gershwin, 1999).

Полученные в настоящей работе данные позволяют сделать предварительный вывод, что большинство “жизнеспособных” отклонений в морфологии эфир, формирующихся при химической индукции индолем в исследованном диапазоне, соответствуют отмеченным отклонениям, обнаруженным в естественных популяциях *Aurilia aurita*, которые сформировались в результате естественной индукции стробилиации. Вместе с тем, при химической индукции наблюдалось возрастание частоты встречаемости отклонений по сравнению с естественными популяциями. Следовательно, можно предположить, что химическая индукция повышает частоту “естественных” ошибок процесса стробилиации. Происходит возрастание частоты нарушений пространственной разметки развивающегося зачатка (изменяется количество одинаковых частей (лопастей, ропалиев)), нарушаются процессы формообразования при трансфор-

мации тканей полипа в эфиры. Можно также предположить, что при химической индукции стробилияция увеличивается частота формирования “нежизнеспособных” отклонений, однако проверка этого утверждения требует проведения дополнительных лабораторных сравнительных экспериментов с химической и “естественной” индукцией стробилияции на однородном материале.

Вопрос о возможной зависимости эффекта воздействия индола от его концентрации остается открытым. В большинстве случаев наблюдаемые различия статистически недостоверны. Однозначно можно только утверждать, что при минимальной из испытанных концентраций индола (5 нМ) доля нормальных эфир без отклонений была статистически выше, чем при более высоких концентрациях индуктора, а доля эфир с “нежизнеспособными” отклонениями — минимальна.

Возможный дозо-зависимый эффект воздействия индола на процесс стробилияции проявляется в том, что при самой низкой концентрации индуктора стробилияция в ряде случаев начинается, но не заканчивается отделением нормальных эфир. При наименьшей испытанной концентрации процесс сегментации полипа иногда приводил к формированию неполного числа возможных зачатков, которые отделялись от материнского полипа, но дифференцировались в полипы, а не в эфиры (рис. 3). С возрастанием концентрации индола такой эффект исчезал при одновременном увеличении числа формируемых эфир (табл. 1). С другой стороны, при продолжительной инкубации полипов *A. aurita* в растворе индола концентрацией 50 мкМ, стробилияция может не останавливаться до полного подразделение тканей на зачатки эфир; в результате зачатки эфир на завершающей стадии имели неправильное строение из-за нехватки тканей (Helm, Dunn, 2017).

То, что в большинстве случаев каждая эфира имела в среднем более двух вариантов отклонений, может указывать на взаимосвязь развития таких отклонений. То есть, формирование разных вариантов морфологических отклонений может быть связано либо с одними и теми же регуляторными механизмами, либо формирование одной структуры зависит от правильности развития предшествующей структуры. Однако достоверный анализ таких корреляций и выявление механизмов взаимосвязанного развития структур требует проведения экспериментов на значительно более многочисленной выборке с тщательной и детальной регистрацией всей истории развития каждой из эфир. Тем более, что ранее высказывалось мнение, что, по крайней мере, некоторые отклонения (изменение числа ропалиев), не оказывают влияние на другие части тела, которые могут варьировать независимо друг от друга (Browne, 1895).

Характер развития процесса стробилияции при химической индукции индолом подтвердил выявленный ранее факт, что индуцирующий сигнал распространяется от орального полюса к абсорбальному (Kroiher et al., 2000; Berking et al., 2005), а не проявляется одновременно по всей длине тела полипа. Вполне возможно, что сила индукции меняется “пропорционально” концентрации индуктора и времени экспозиции в растворе индуктора. При этом существует некоторая пороговая величина концентрации использованного индуктора (с учетом времени экспозиции). Воздействие индуктора в концентрации, превышающей пороговую, однозначно вызывает запуск процесса стробилияции (по принципу “все или ничего”). При концентрациях индуктора ниже пороговой — вероятность нормального (полноценного) развития процесса стробилияции снижается из-за ослабления индуцированного эндогенного сигнала. Полученные в данной работе данные в определенной мере подтверждают это предположение: число сформированных и отделившихся эфир при длительном воздействии индола в концентрации 5 нМ оказалось наименьшим, то есть данная концентрация использованного индуктора находится на уровне порогового значения. При увеличении концентрации индола число формируемых эфир увеличивается, но не существенно и не пропорционально концентрации. То есть экзогенный индуцирующий сигнал определенной величины или однозначно вызывает запуск процесса стробилияции всего полипа, или величина индуцированного эндогенного сигнала оказывается достаточной только для запуска процесса стробилияции на ограниченном участке, и процесс “затухает” без дополнительной стимулирующей экзогенной поддержки. Более того, воздействие индуктора в низкой концентрации вызывало “сегментацию” полипа, но не вызывало дифференцировки тканей полипа в эфиры. Это, на наш взгляд, служит подтверждением тому, что процессы подразделения тела материнского полипа на зачатки (диски) и дифференцировка зачатков в эфиры — это процессы, жестко не связанные друг с другом. Возможно, что и полноценное развитие эфир зависит от “суммарной величины и продолжительности воздействия” экзогенного индуцирующего сигнала. То, что процессы “сегментации” полипа и дифференцировки тканей полипа в ткани эфиры — это различные явления, было показано еще в работах Кроэра с коллегами (Kroiher et al., 2000), которые показали, что “запуск” программы трансдифференцировки свойств тканей опережает видимую сегментацию полипа примерно на сутки. Возможно также, что процесс подразделения на диски и процесс дифференцировки в эфиры могут идти практически независимо друг от друга; по крайней мере — заключительная часть “сегментации” тела полипа — отделение — не

зависит от того, начался и прошел ли процесс дифференцировки тканей. Так, ряд исследований показывает, что полипы, приступившие к сегментации после непродолжительного снижения температуры воды, могут не завершить ее, если их вернуть в привычные условия до начала формирования ропалиев у эфир. В таком случае, те ткани, которые уже были обособлены перетяжками, могут отделиться и превратиться в полипы (Berrill, 1949; Spangenberg, 1965a; Kakinuma, 1975). Однако, это возможно только до определенного критического момента, после которого даже искусственно отделенные от материнской особи диски завершают превращение в эфир.

Сравнивая эти данные с полученными результатами, можно выдвинуть предположение, что развитие тех или иных отклонений в процессе отделения эфир от стробилы зависит от времени ослабления сигнала, индуцирующего развитие стробилиции. Например, если полип находится на стадии ранней стробилы, то есть формирование зачатков лопастей эфир еще не началось, и упомянутый сигнальный фактор теряет свою силу (например, в результате деградации индуктора), то зачатки эфир отделяются от материнского полипа и превращаются в полипы. Такая ситуация наблюдалась при индукции стробилиции 5 нМ раствором индола во второй и третьей серии экспериментов. При чуть более высокой, но не пороговой концентрации индуктора, индуцирующий сигнал может ослабевать в момент перехода полипа к стадии средней стробилы. К этому моменту зачатки эфир, расположенные в верхней части стробилы, уже приступают к развитию лопастей, в то время как нижние зачатки остаются на начальных стадиях развития. В таком случае возможно формирование эфир с неправильным развитием, которые отделяются от материнской особи, но не отделяются друг от друга. Такая ситуация наблюдалась при индукции полипов во второй и третьей серии экспериментов. Стоит отметить, что при индукции стробилиции 5–25 нМ раствором индуктора такие группы эфир формировались у 20–40% полипов в двух сериях экспериментов. При индукции стробилиции 1–5 мкМ раствором индуктора подобное отклонение встретилось у 80–100% индуцированных полипов. Если же сигнал затухает ближе к аборальной части стробилы, последняя эфира оказывается неспособной завершить свое нормальное развитие из-за ослабления сигнала – дифференцировка тканей эфиры запускается, но не завершается полностью. В результате она либо не отделяется от полипа, либо отделяется вместе с частью тканей материнского полипа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы проанализированы разнообразные отклонения в морфо-

логии эфир, сформированных в результате химической индукции разными концентрациями 5-метокси-2-метилендола клональных полипов *Aurelia aurita* из Черного моря. Полученные данные свидетельствуют, что большинство выявленных “жизнеспособных” отклонений соответствуют таковым, описанным в литературе. Однако, применение химической индукции повышает вероятность формирования эфир с отклонениями. Кроме того, показано формирование “нежизнеспособных” отклонений, обнаружение которых в естественных условиях практически невозможно. В подавляющем большинстве случаев у каждой из эфир наблюдался комплекс отклонений в строении, что может свидетельствовать о взаимосвязи формируемых отклонений. Высказано предположение, что влияние использованного химического индуктора на частоту формирования отклонений в морфологии эфир может иметь доза-зависимый эффект.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование образцов на сканирующем электронном микроскопе было проведено в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Авторы выражают благодарность рецензентам за конструктивные замечания и рекомендации, которые помогли существенно улучшить работу.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке НТУ “Сириус” и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-51015). Создание и поддержание культур сцифополипов поддержано проектом РФФИ № 19-04-01131a.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

П.С. Мостовщикова и И.А. Косевич продумали и разработали эксперимент, П.С. Мостовщикова провела основное экспериментальное исследование, Д.М. Саидов провел статистическую обработку данных, П.С. Мостовщикова и И.А. Косевич провели микроскопическое исследование образцов. П.С. Мостовщикова и

И.А. Косевич участвовали в подготовке рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, подготовке иллюстраций и редактировании конечного варианта рукописи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондарь Н.И. Сравнение становления полярности главной оси тела при бесполом размножении *Aurelia* sp. и *Cassiopea* sp. (Scyphozoa, Cnidaria) / Дипломная работа. МГУ им. М.В. Ломоносова. М., 2019. 67 с.
- Догель В.А. Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов. 7-е изд., перераб. и доп. / Под ред. Полянского Ю.И. М.: Высшая школа, 1981. 603 с.
- Заика В.Е. Частота морфологических аномалий у медуз *Aurelia aurita* (L.) в Черном море // Морской экологический журн. 2005. Т. 4. № 2. С. 51–57.
- Иванова-Казас О.М. Бесполое размножение животных. Ленинград: Издательство Ленинградского Университета, 1977. 240 с.
- Сухонутова А.В. Гистологическое исследование способов бесполого размножения у *Aurelia aurita* (Scyphozoa) / Дипломная работа. МГУ им. М.В. Ломоносова. М., 2013. 71 с.
- Сухонутова А.В., Краус Ю.А. Пластичность реакции полипов *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) на сигнальный фактор, регулирующий их жизненный цикл // Зоологический журн. 2017. Т. 96. № 11. С. 1309–1318.
- Berking S., Czech N., Gerharz M., Herrmann K., Hoffmann U., Raifer H., Sekul G., Siefker B., Sommerei A., Vedder F. A newly discovered oxidant defense system and its involvement in the development of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria): reactive oxygen species and elemental iodine control medusa formation // Int. J. Dev. Biol. 2005. V. 49. № 8. P. 969–976.
- Berking S., Herrmann K. Compartments in Scyphozoa // Int. J. Dev. Biol. 2007. V. 51. № 3. P. 221–228.
- Berrill N.J. Developmental analysis of scyphomedusae // Biol. Rev. 1949. V. 24. № 4. P. 393–410.
- Brekhman V., Malik A., Haas B., Sher N., Lotan T. Transcriptome profiling of the dynamic life cycle of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 74.
- Browne E.T. Memoirs: On the variation of the tentaculocysts of *Aurelia aurita* // J. Cell Sci. 1895. V. 2. № 147. P. 245–251.
- Browne E.T. Variation in *Aurelia aurita* // Biometrika. 1901. V. 1. № 1. P. 90–108.
- Brusca R.C., Brusca G.J. Invertebrates. Sunderland: Sinauer, 2003. 936 p.
- Cabrales-Arellano P., Islas-Flores T., Thome P.E., Villanueva M.A. Indomethacin reproducibly induces metamorphosis in *Cassiopea xamachana* scyphistomae // PeerJ. 2017. V. 5. P. e2979.
- Chernyshev A.V., Isaeva V.V. Formation of chaotic patterns of the gastrovascular system in the ontogenesis of the medusa *Aurelia aurita* // Russian J. Marine Biology. 2002. V. 28. № 5. P. 347–351.
- Custance D.R.N. Light as an inhibitor of strobilation in *Aurelia aurita* // Nature. 1964. V. 204. № 4964. P. 1219–1220.
- Dawson M.N. Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia* (Cnidaria: Scyphozoa) // Mar. Biol. 2003. V. 143. № 2. P. 369–379.
- Dawson M.N., Jacobs D.K. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) // Biol. Bull. 2001. V. 200. № 1. P. 92–96.
- Fuchs B., Wang W., Graspentner S., Li Y., Insua S., Herbst E.-M., Dirksen P., Böhm A.-M., Hemmrich G., Sommer F., Domazet-Loao T., Klostermeier Ulrich C., Anton-Erxleben F., Rosenstiel P., Bosch Thomas C.G., Khalturin K. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita* // Cur.Biol. 2014. V. 24. № 3. P. 263–273.
- Genikhovich G. How do developmental programs evolve? // Old Questions and Young Approaches to Animal Evolution / Eds. Martin-Duran J.M., Vellutini B.C. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 73–106.
- Gershwin L.A. Clonal and population variation in jellyfish symmetry // J. Marine Biol. Assoc. UK. 1999. V. 79. P. 993–1000.
- Gold D.A., Katsuki T., Li Y., Yan X., Regulski M., Ibberson D., Holstein T., Steele R.E., Jacobs D.K., Greenspan R.J. The genome of the jellyfish *Aurelia* and the evolution of animal complexity // Nature Ecology & Evolution. 2019. V. 3. № 1. P. 96–104.
- Gold D.A., Nakanishi N., Hensley N.M., Cozzolino K., Tabatabaee M., Martin M., Hartenstein V., Jacobs D.K. Structural and developmental disparity in the tentacles of the moon jellyfish *Aurelia* sp. 1 // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0134741.
- Hamner W.M., Jenssen R.M. Growth, degrowth, and irreversible cell differentiation in *Aurelia aurita* // Amer. Zool. 1974. V. 14. № 2. P. 833–849.
- Hargitt C.W. Variation among hydromedusae // Biol. Bull. 1901. V. 2. № 5. P. 221–255.
- Helm R.R., Dunn C.W. Indoles induce metamorphosis in a broad diversity of jellyfish, but not in a crown jelly (Crownatae) // PLoS One. 2017. V. 12. № 12. P. e0188601.
- Holst S. Effects of climate warming on strobilation and ephyra production of North Sea scyphozoan jellyfish // Jellyfish Blooms IV. Developments in Hydrobiology / Eds. Purcell J. et al. Dordrecht: Springer, 2012. P. 127–140.
- Kakinuma Y. An experimental study of the life cycle and organ differentiation of *Aurelia aurita* Lamarck // Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi. 1975. V. 15. № 3. P. 101–113.
- Khalturin K., Shinzato C., Khalturina M., Hamada M., Fujie M., Koyanagi R., Kanda M., Goto H., Anton-Erxleben F., Toyokawa M., Toshino S., Satoh N. Medusozoan genomes inform the evolution of the jellyfish body plan // Nature Ecology & Evolution. 2019. V. 3. № 5. P. 811–822.
- Kroiher M., Siefker B., Berking S. Induction of segmentation in polyps of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) into medusae and formation of mirror-image medusa anlagen // Int. J. Dev. Biol. 2000. V. 44. № 5. P. 485–490.
- Kuniyoshi H., Okumura I., Kuroda R., Tsujita N., Arakawa K., Shoji J., Saito T., Osada H. Indomethacin induction of metamorphosis from the asexual stage to sexual stage in the moon jellyfish, *Aurelia aurita* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2012. V. 76. № 7. P. 1397–1400.
- Miyake H., Iwao K., Kakinuma Y. Life history and environment of *Aurelia aurita* // South Pacific Study. 1997. V. 17. № 2. P. 273–285.

- Nakanishi N., Yuan D., Hartenstein V., Jacobs D.K.* Evolutionary origin of rhopalial: insights from cellular-level analyses of Otx and POU expression patterns in the developing rhopalial nervous system // *Evol. Dev.* 2010. V. 12. № 4. P. 404–415.
- Nakanishi N., Yuan D., Jacobs D.K., Hartenstein V.* Early development, pattern, and reorganisation of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa) // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 511–524.
- R Core Team* R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. URL <https://www.R-project.org/>.
- Spangenberg D.B.* A study of strobilation in *Aurelia aurita* under controlled conditions // *J. Exp. Zool.* 1965a. V. 160. № 1. P. 1–9.
- Spangenberg D.B.* Cultivation of the life stages of *Aurelia aurita* under controlled conditions // *J. Exp. Zool.* 1965b. V. 159. № 3. P. 303–318.
- Spangenberg D.B.* Iodine induction of metamorphosis in *Aurelia* // *J. Exp. Zool.* 1967. V. 165. № 3. P. 441–449.
- Spangenberg D.B.* Thyroxine induced metamorphosis in *Aurelia* // *J. Exp. Zool.* 1971. V. 178. № 2. P. 183–194.
- Spangenberg D.B.* Rhopalium development in *Aurelia aurita* ephyrae // *Coelenterate Biology: Recent Research on Cnidaria and Ctenophora* / Eds. Williams R.B., Cornelius P.F.S., Hughes R.G., Robson E.A. *Hydrobiologia.* 1991. № 216. P. 45–49.
- Straehler-Pohl I., Widmer C.L., Morandini A.C.* Characterizations of juvenile stages of some semaeostome Scyphozoa (Cnidaria), with recognition of a new family (Phacellophoridae) // *Zootaxa.* 2011. V. 2741. № 1. P. 1–37.
- Sukhoputova A.V., Kraus Y.A.* Environmental factors inducing the transformation of polyp into medusae in *Aurelia aurita* (Scyphozoa) // *Russian J. Developmental Biology.* 2017. V. 48. № 2. P. 106–116.
- Sukhoputova A.V., Kraus Y.A., Kirillova A.O., Markov A.V.* Differentiation of the oral-aboral axis and body parts during life cycle transitions in Scyphozoa // *Biol. Bull. Rev.* 2019. V. 9. № 5. P. 412–431.
- Technau U., Genikhovich G., Kraus J.E.M.* Cnidaria // *Evolutionary developmental biology of invertebrates.* Springer. 2015. V. 1. P. 115–163.
- Technau U., Steele R.E.* Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria // *Development.* 2011. V. 138. № 8. P. 1447–1458.
- Uchida V., Nagao Z.* The metamorphosis of the scyphomedusa, *Aurelia limbata* (Brandt) // *Annotationes Zoologicae Japonenses.* 1963. V. 36. № 2. P. 83–91.
- Vannucci M.* Double monster ephyrae of *Aurelia aurita* // *Nature.* 1957. V. 179. № 4554. P. 326–327.
- Wang W.* Regulation of metamorphosis and the evolution of life cycles: insights from the common moon jelly *Aurelia aurita*: Dissertation / Bosch E.G.P.D.D.h.c.T., Khalaturin Z.G.P.D.K. Universitätsbibliothek Kiel. Kiel, 2017. 116 p.
- Yamamori L., Okuizumi K., Sato C., Ikeda S., Toyohara H.* Comparison of the inducing effect of indole compounds on medusa formation in different classes of Medusozoa // *Zool. Sci.* 2017. V. 34. № 3. P. 173–178.
- Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K., Hartenstein V.* Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 525–539.
- Zimmermann B., Robert N.S.M., Technau U., Simakov O.* Ancient animal genome architecture reflects cell type identities // *Nature Ecology & Evolution.* 2019. V. 3. № 9. P. 1289–1293.

## Morphological Deviations in Ephyra after Chemical Induction of Strobilation in *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria)

P. S. Mostovshikova<sup>1, \*</sup>, D. M. Saidov<sup>2</sup>, and I. A. Kosevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Educational Center “Sirius”, Olympiyskiy prospect 40, Sochi, 354349 Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: [etonemoimail@gmail.com](mailto:etonemoimail@gmail.com)

*Aurelia aurita* is a representative of Cnidaria with well-studied life cycle. Recently this species became a model object in investigation of developmental processes among cnidarians, including specific variant of asexual reproduction by strobilation – ephyrae (medusa larvae) formation through transverse polyp fission. In most cases, prolonged decreasing of water temperature is the natural inducing factor initiating strobilation. However, necessity for long lasting induction and unpredictability of a result hampers studies with this model object. That is why, diverse chemical substances resembling structurally supposed “hormone of strobilation” are used in laboratory. Present work presents the data on the observed deviations in the process of strobilation and morphological malformations in ephyra of *A. aurita* developed in the laboratory conditions after chemical induction with 5-methoxy-2-methylindole. For the first time the morphological deviations obtained after artificial induction compared with morphological deviations of ephyrae and medusa from natural environments. It is proposed that the chemical induction increases the frequency of morphological deviations development in the process of strobilation affecting spatial patterning and differentiation of the ephyra rudiments.

**Keywords:** Cnidaria, Scyphozoa, *Aurelia aurita*, polyp, ephyra, medusa, induction of strobilation, 5-methoxy-2-methylindole, morphological deviations

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 597.423:577.115:591.3

СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОМАССЕ МОЛОДИ  
СИБИРСКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER BAERII*, BRANDT, 1869)  
В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРНОГО ВЫРАЩИВАНИЯ

© 2022 г. А. Е. Рудченко<sup>а</sup> \*, Л. А. Меньшикова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

<sup>б</sup>Енисейский филиал ФГБУ «Главрыбвод», о. Отдыха, 19/3, Красноярск, 660093 Россия

\*e-mail: arudchenko@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 14.09.2021 г.

После доработки 06.12.2021 г.

Принята к публикации 10.12.2021 г.

Проведено исследование состава и содержания жирных кислот в биомассе молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*), выращенного в аквакультуре, для пополнения численности популяции осетра в р. Енисей. Для изучения динамики состава жирных кислот, в процессе роста молодь исследовали на разных стадиях постэмбрионального развития – в период эндогенного и экзогенного питания. Было установлено, что на состав жирных кислот в биомассе молоди значительное влияние оказывает источник пищи. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты используются молодь сибирского осетра в качестве источников энергии для роста и развития. Полиненасыщенные жирные кислоты и докозагексаеновая кислота (ДГК) имели тенденцию к накоплению в биомассе осетра от стадии предличинки до стадии сеголетка. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и ДГК ( $\text{мг г}^{-1}$ ) значительно снижалось к стадии сеголетка из-за уменьшения общего содержания жирных кислот в биомассе молоди осетра. Однако уровни ЭПК и ДГК в биомассе сеголеток сибирского осетра перед выпуском в естественную среду обитания были на относительно высоком уровне, что может способствовать развитию необходимых адаптивных реакций и высокому уровню выживаемости молоди.

**Ключевые слова:** сибирский осетр, жирные кислоты, липиды, постэмбриональное развитие, аквакультура

**DOI:** 10.31857/S0475145022020124

## ВВЕДЕНИЕ

Осетровые виды рыб, в частности сибирский осетр (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), являются одними из самых ценных видов рыб. Однако численность популяций осетровых рыб в бассейнах российских рек неуклонно снижалась с середины прошлого века (Гадинов и Крючкова, 2008). Такая динамика была вызвана, в первую очередь, переловом и браконьерством, а также ухудшением условий окружающей среды, вызванным загрязнением и изменением уровня режима рек (Jalali et al., 2008; Nieminen et al., 2014). Популяция сибирского осетра реки Енисей значительно пострадала после массового перелова в середине прошлого века (Гадинов и Крючкова, 2008). Восстановление этой популяции осетра затрудняется значительным браконьерским выловом. Кроме того, сибирский осетр долго достигает половой зрелости, имеет значительные интервалы между икрометанием и относительно низкую плодови-

тость в северных водных экосистемах (Nieminen et al., 2014).

Аквакультурное выращивание молоди осетровых рыб с последующим выпуском в естественную среду обитания является одним из главных методов восстановления численности популяции этих видов рыб (Luo et al., 2017). Выращивание личинок рыб в контролируемых условиях аквакультуры способствует правильному развитию молоди рыб, рост которой зависит от многих факторов, таких как температура, соленость, концентрация кислорода, количество и качество пищи (Engstrom-Ost et al., 2005). Необходимым условием для успешного выращивания личинок рыб является также оптимальный состав жирных кислот (ЖК) в корме (Lund et al., 2012). Наиболее важными ЖК в питании молоди рыб являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), такие как: омега 6 арахидоновая кислота (АРК, 20:4n-6), а также эйкозапентаеновая (ЭПК, 20:5n-3) и, в особенности, докозагексаеновая (ДГК, 22:6n-3) кислоты

Таблица 1. Характеристика молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*)

	Возраст, дни	Питание	<i>L</i> , мм	<i>W</i> , г	Общие липиды, мг г <sup>-1</sup> (сырой массы)	<i>N</i> , экз
Предличинки	0	Эндогенное	14.8 ± 3.5	0.017 ± 0.006	235.5 ± 21.3	20
Личинки	4	Эндогенное	16.2 ± 2.8	0.028 ± 0.009	162.2 ± 13.2	20
Мальки	20	Корм	31.2 ± 5.9	0.089 ± 0.010	46.2 ± 3.6	20
Сеголетки	65	Корм	73.8 ± 15.1	0.951 ± 0.220	6.7 ± 2.8	15

омега 3 серии. АРК и ЭПК являются предшественниками липидных медиаторов, принимающих участие в стрессовых реакциях организма молоди рыб (Tocher, 2010). ДГК – важный структурный компонент мембраны нервных клеток и принимает активное участие в формировании первичных нервных тканей (Luo et al., 2017). Дефицит этой кислоты в организме личинок и молоди рыб приводит к нарушению развития мозга, снижению чувствительности к слуховым и визуальным стимулам, слабой реакции на стресс, снижению фагоцитарной активности клеток против патогенов, появлению аномалий в развитии (Montero et al., 2003; Tocher, 2010; Lund et al., 2012; Mesa-Rodriguez et al., 2018). Дефицит ЭПК и ДГК в корме подращиваемого в аквакультуре осетра может привести к повышенной смертности молоди рыб при ее выпуске в естественную экосистему из-за значительных изменений условий обитания. Что, в свою очередь, может привести к снижению эффективности мероприятий по восполнению численности диких популяций осетров.

Целью данного исследования являлась оценка состава и содержания ЖК в молоди сибирского осетра, выращиваемой в аквакультуре, с момента вылупления из икры до выпуска в естественную среду обитания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аквакультурное подращивание молоди сибирского осетра для восполнения популяции р. Енисей осуществляется ТОСП “Белоярский рыбо-разводный завод” ФГБУ “Главрыбвод” (Республика Хакасия, Алтайский район, пос. Изыхские Копи), который ежегодно выпускает в реку более 1.5 млн молоди осетра. Половые продукты сибирского осетра отбирались у диких производителей из р. Енисей (район п. Бор, Туруханский район, Красноярский край) в июне 2017 г. Оплодотворенная икра доставлялась на Белоярский рыбо-разводный завод для выращивания молоди в условиях аквакультуры. После выклева и личино-трофной фазы личинок, осетра кормили коммерческим кормом (Sorrens, Голандия). Для проведения исследования Белоярским рыбо-разводным заводом были предоставлены пробы молоди сибирского осетра на разных стадиях постэмбрио-

нального развития и используемый при подращивании корм (табл. 1).

Отобранные для анализа предличинки, личинки и сеголетки осетра, а так же корм, фиксировались раствором хлороформ : этанол (2 : 1 по объему). Для определения состава и содержания ЖК из биомассы молоди экстрагировали липиды по методу Фолча с модификацией (Gladyshev et al., 2015). Полученный экстракт делили на две части. Из обеих частей на роторном испарителе удаляли растворитель. Первая часть сухого экстракта использовалась для гравиметрического определения содержания общих липидов. Из второй части липидных экстрактов методом щелочного метанолиза получали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Для получения МЭЖК к экстрактам добавляли 1 мл гексана и 0.2 мл свежего 3 М метанольного раствора метоксида натрия и смесь энергично встряхивали в течение 1 мин. Затем смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин и останавливали реакцию добавлением 3 мл гексана и 5 мл насыщенного раствора NaCl. МЭЖК экстрагировали в течение 1 мин, смесь переносили в делительную воронку и отбрасывали нижний водный слой. Гексановый слой дополнительно дважды промывали 5 мл дистиллированной воды. Затем гексановый раствор МЭЖК сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и гексан удаляли на роторном испарителе при 30°C (Sushchik et al., 2020). Полученные МЭЖК хранили при температуре – 20°C до последующих анализов. Анализ МЭЖК проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором (модель 6890/5975С, “Agilent Technologies”, США) с колонкой HP-FFAP. Идентификацию пиков жирных кислот осуществляли по полученным масс-спектрам, сравнением их с имеющимися в базе данных AgilentNIST2005, а также сравнением времен удерживания с такими стандартами (Sigma, США). Количественное содержание индивидуальных ЖК в биомассе молоди осетра (*C<sub>i</sub>*, мг г<sup>-1</sup> сырой массы) определяли по формуле:

$$C_i = (S_i \times C_{st} \times W_{st}) / (W_p \times S_{st}),$$

где *C<sub>st</sub>* – концентрация внутреннего стандарта (мг мл<sup>-1</sup>), *S<sub>i</sub>* – площадь пика ЖК (условные единицы), *S<sub>st</sub>* – площадь пика внутреннего стандарта (условные единицы), *W<sub>p</sub>* – масса пробы (г), *W<sub>st</sub>* –

объем добавленного внутреннего стандарта (мл). В качестве внутреннего стандарта использовали метиловый эфир 19:0, который добавляли в каждую пробу перед экстракцией липидов.

Статистические расчеты были выполнены в программах Microsoft Excel и STATISTICA 9.0. Достоверность отличий процентного содержания отдельных ЖК в биомассе предличинок и личинок оценивалась по критерию Манна–Уитни. Для определения статистически значимых отличий процентного и количественного содержания ЖК в корме и молоди осетра был использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Достоверность отличий оценивалась по критерию Фишера при уровне значимости  $p \leq 0.05$ . Для проверки гипотезы о принадлежности выборки нормальному закону распределения, был использован критерий Колмогорова–Смирнова. Выявление основных отличий в ЖК составе молоди осетра на разных стадиях постэмбрионального развития проводили методом анализа главных компонент.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ процентного состава ЖК в молоди осетра на разных стадиях постэмбрионального развития представлен в табл. 2 и 3. В ЖК составе молоди осетра при переходе на эндогенное питание было обнаружено снижение процентного содержания ряда ЖК (14:0, 15:0, 16:1n-7, C15-17 PЖК, 17:0, 18:1n-7, 20:4n-6, 24:6). Кроме того, отмечалось значительное снижение процентного содержания насыщенных жирных кислот (НЖК) и мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) в составе ЖК личинок осетра по сравнению с предличинками. В ЖК составе личинок осетра значительно возросло процентное содержание ряда отдельных ЖК (16:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:1n-9, 20:5n-3,  $\Sigma$  22:1, 22:6n-3), а также суммарное процентное содержание ПНЖК.

В ЖК составе мальков осетра, по сравнению с сеголетками, были обнаружены достоверно более высокие уровни таких ЖК, как 14:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 24:6 и суммарное процентное содержание МНЖК. Напротив, относительное содержание 16:0, 16:1n-9, C15-17 ВФА, 18:0, 20:1n-9, 20:4n-6, 20:5n-3,  $\Sigma$  22:1, 22:5n-3, 22:6n-3, а также НЖК было значительно выше в сеголетках осетра. В ЖК составе корма высокие проценты имели 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6 и 22:6n-3. При этом уровень 14:0, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3,  $\Sigma$  22:1,  $\Sigma$  24:1 в корме был достоверно выше, чем в питающемся им молоди осетра, тогда как процентное содержание 16:0, 16:1n-9, C15-17 ВФА, 18:0, 18:1n-7, 20:2n-6, 20:4n-6, 22:6n-3, 24:6, 24:5 и НЖК было достоверно ниже.

Мультивариантный анализ методом главных компонент ЖК состава молоди осетра на постэмбриональных этапах развития и аквакультурного корма (рис. 1) показал, что по фактору первой компоненты, дающей 46% общей вариации, ЖК состав корма отличался высокими процентами 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3. В тоже время ЖК состав предличинок и личинок осетра отличал высокий уровень жирных кислот C15-17 с разветвленной цепью атомов углерода (PЖК), 18:1n-7, 16:1n-7 и 20:4n-6. Второй фактор (29.5% вариации) показал отличие ЖК состава сеголеток осетра из-за высокого содержания 16:0, 18:0 и 22:6n-3. Состав ЖК мальков осетра отличало высокое содержание C24 ПНЖК.

Содержание общих липидов ( $\text{мг г}^{-1}$  сырой массы) в биомассе молоди сибирского осетра было максимальным на стадии предличинки и снизилось к этапу сеголетка почти в 30 раз (табл. 1). Суммарное содержание ЖК в биомассе молоди осетра имело сходную динамику и снизилось с  $179 \pm 22.8$  и  $146 \pm 12.3$   $\text{мг г}^{-1}$  (сырой массы) у предличинок и личинок до  $39.1 \pm 8.3$  и  $5.8 \pm 1.4$   $\text{мг г}^{-1}$  у мальков и сеголеток соответственно (рис. 2). Содержание ЭПК и ДГК ( $\text{мг г}^{-1}$  сырой массы) в биомассе предличинок и личинок осетра было достоверно выше, чем на более поздних стадиях постэмбрионального развития (рис. 2). Содержание ЭПК в биомассе предличинок и личинок осетра составляло  $7.2 \pm 0.5$  и  $8.8 \pm 0.5$   $\text{мг г}^{-1}$ , ДГК —  $14.7 \pm 0.6$  и  $16.7 \pm 0.7$   $\text{мг г}^{-1}$  соответственно. У мальков и сеголеток осетра содержание ЭПК было значительно ниже и составляло  $0.5 \pm 0.0$  и  $0.2 \pm 0.0$   $\text{мг г}^{-1}$ , а ДГК —  $1.5 \pm 0.0$  и  $0.6 \pm 0.0$  соответственно. Общее содержание ЖК в биомассе молоди осетра также значительно снижалось в процессе постэмбрионального развития (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Состав ЖК биомассы предличинок и личинок сибирского осетра, вероятно, отражает эндогенный характер питания молоди. На это указывают повышенные уровни ряда биомаркерных ЖК. Так, у предличинок и личинок осетра, по сравнению с мальками и предличинками, был отмечен достоверно более высокий уровень 16:1n-7 — маркера диатомовых водорослей (Sushchik et al., 2003), 15-17 PЖК и 18:1n-7 — маркера бактериального вещества (Napolitano, 1999), а также 20:4n-6 — маркера аллохтонной органики (Gladyshev et al., 2015). Перечисленные биомаркерные ЖК попадают в организм самок осетра в процессе нагула по цепям питания, накапливаются в желточном мешке ооцитов и, таким образом, отражают бентосный характер питания данного вида рыб. Кроме того, на состав ЖК предличинок и личинок сибирского осетра оказывают влияние и особенности физио-

**Таблица 2.** Состав жирных кислот (% от суммы ЖК) в биомассе молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*) в период эндогенного питания, выращенной в аквакультуре

	Предличинка			Личинка			U	p
	m	±	SE	m	±	SE		
14:0	5.1	±	0.4	0.8	±	0.3	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
15:0	1.9	±	0.2	0.3	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
16:0	17.6	±	0.4	19.8	±	0.2	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
16:1n-7	14.7	±	0.5	9.8	±	0.6	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
16:1n-6 + n-5	0.4	±	0.0	0.1	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
C15-17 PЖК	1.2	±	0.1	0.8	±	0.1	<b>1.0</b>	<b>0.0162</b>
17:0	0.6	±	0.0	0.2	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
18:0	2.9	±	0.0	2.6	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
18:1n-9	19.6	±	0.1	26.1	±	0.6	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
18:1n-7	7.9	±	0.1	5.9	±	0.4	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
18:2n-6	1.2	±	0.0	5.7	±	0.7	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
18:3n-3	0.3	±	0.0	0.7	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
20:1n-9	0.4	±	0.0	0.8	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
20:4n-6	2.8	±	0.1	2.3	±	0.1	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
20:3n-3	0.1	±	0.0	0.2	±	0.0	4.0	0.0758
20:4n-3	0.2	±	0.0	0.3	±	0.0	<b>1.0</b>	<b>0.0163</b>
20:5n-3	4.0	±	0.4	5.2	±	0.4	4.0	0.0758
Σ 22:1	0.1	±	0.0	0.3	±	0.0	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
22:5n-3	1.7	±	0.2	2.0	±	0.2	8.0	0.3472
22:6n-3	8.2	±	0.4	9.8	±	0.2	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
24:5n-3	0.0	±	0.0	0.1	±	0.0	7.0	0.2506
24:6n-3	0.3	±	0.0	0.1	±	0.0	<b>1.0</b>	<b>0.0163</b>
НЖК	30.1	±	0.7	24.8	±	0.3	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>
МНЖК	48.1	±	0.5	45.4	±	0.5	<b>1.0</b>	<b>0.0163</b>
ПНЖК	21.8	±	1.1	29.9	±	0.3	<b>0.0</b>	<b>0.0090</b>

Примечание. U – значения критерия Манна–Уитни, p – уровень значимости (достоверные значения выделены жирным шрифтом при  $p \leq 0.05$ ), SE – стандартная ошибка.

логических процессов, происходящих в организме молоди рыб на первых этапах постэмбрионального развития. Дифференцировка органов, синтез сигнальных молекул иммунной и гуморальной систем, метаболический обмен, связанный с процессами роста, движения и поддержания постоянства внутренней среды и другие физиологические процессы приводят к избирательному накоплению одних ЖК и преимущественной трате других (Kamler, 2008; Ronnestad et al., 2013; Pederzoli, Mola, 2016). Так, в данном исследовании мы видим, что процентное содержание НЖК и МНЖК в биомассе личинок осетра к концу эндогенного питания значительно снижалось. Это может быть связано с тем, что НЖК и МНЖК чаще всего являются основными ЖК триацилглицеролов (ТАГ). Известно, что ТАГ могут использоваться рыбами как источник энергии для процессов роста и раз-

вития (Tocher, 2003). Использование ТАГ в качестве источника энергии было отмечено для личинок кумжи (*Salmo trutta*) после выклева (Voropin et al., 2021). Таким образом, НЖК и МНЖК, накопленные в желточном мешке, могли быть основным источником энергии молоди осетра в период эндогенного питания.

Уровень ПНЖК, в частности 20:5n-3 и 22:6n-3, от стадии предличинки к стадии личинки достоверно увеличился. Накопление в биомассе молоди осетра этих кислот может быть вызвано повышением синтеза фосфолипидов (ФЛ) – структурных компонентов мембран клеток. Начальные этапы постэмбрионального развития рыб сопровождаются активным ростом клеток и тканей организма, что может привести к накоплению ФЛ и их компонентов ПНЖК в биомассе молоди рыб (Kamler, 2008; Tocher, 2010). Активный синтез ФЛ

**Таблица 3.** Состав жирных кислот (% от суммы ЖК) в корме и биомассе выращенной в аквакультуре молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*) после перехода на экзогенное питание

	Корм			Мальки			Сеголетки			F	p
	m	SE		m	SE		m	SE			
14:0	3.4	±	0.0 <sup>A</sup>	2.6	±	0.0 <sup>B</sup>	1.6	±	0.3 <sup>C</sup>	<b>29.9</b>	<b>0.0000</b>
16:0	13.7	±	0.1 <sup>A</sup>	18.5	±	0.2 <sup>B</sup>	24.8	±	0.6 <sup>C</sup>	<b>246.5</b>	<b>0.0000</b>
16:1n-9	0.2	±	0.0 <sup>A</sup>	0.6	±	0.0 <sup>B</sup>	0.9	±	0.1 <sup>C</sup>	<b>64.3</b>	<b>0.0000</b>
16:1n-7	3.8	±	0.0 <sup>A</sup>	3.6	±	0.1 <sup>A</sup>	2.3	±	0.1 <sup>C</sup>	<b>105.6</b>	<b>0.0000</b>
C15-17 НЖК	0.5	±	0.0 <sup>A</sup>	0.6	±	0.0 <sup>B</sup>	0.7	±	0.0 <sup>B</sup>	<b>10.9</b>	<b>0.0020</b>
18:0	2.8	±	0.1 <sup>A</sup>	4.5	±	0.1 <sup>B</sup>	8.5	±	0.7 <sup>C</sup>	<b>55.8</b>	<b>0.0000</b>
18:1n-9	28.5	±	0.9 <sup>A</sup>	28.5	±	0.1 <sup>A</sup>	18.2	±	0.2 <sup>B</sup>	<b>118.0</b>	<b>0.0000</b>
18:1n-7	2.8	±	0.2 <sup>A</sup>	3.9	±	0.1 <sup>B</sup>	3.8	±	0.0 <sup>B</sup>	<b>36.7</b>	<b>0.0000</b>
18:2n-6	13.0	±	0.1 <sup>A</sup>	8.7	±	0.1 <sup>B</sup>	4.1	±	0.4 <sup>C</sup>	<b>323.3</b>	<b>0.0000</b>
18:3n-3	3.6	±	0.1 <sup>A</sup>	1.5	±	0.0 <sup>B</sup>	0.4	±	0.1 <sup>C</sup>	<b>977.5</b>	<b>0.0000</b>
20:1n-9	3.6	±	0.1 <sup>A</sup>	3.0	±	0.0 <sup>B</sup>	3.8	±	0.2 <sup>A</sup>	<b>8.2</b>	<b>0.0057</b>
20:2n-6	0.5	±	0.0 <sup>A</sup>	0.8	±	0.0 <sup>B</sup>	0.8	±	0.0 <sup>B</sup>	<b>43.1</b>	<b>0.0000</b>
20:4n-6	0.4	±	0.0 <sup>A</sup>	1.0	±	0.0 <sup>B</sup>	2.0	±	0.2 <sup>B</sup>	<b>75.5</b>	<b>0.0000</b>
20:5n-3	5.3	±	0.1 <sup>A</sup>	3.1	±	0.0 <sup>B</sup>	4.6	±	0.1 <sup>B</sup>	<b>201.0</b>	<b>0.0000</b>
Σ 22:1	4.0	±	0.1 <sup>A</sup>	1.0	±	0.0 <sup>B</sup>	1.8	±	0.3 <sup>B</sup>	<b>68.0</b>	<b>0.0000</b>
22:5n-3	1.0	±	0.0 <sup>A</sup>	1.2	±	0.0 <sup>B</sup>	1.1	±	0.0 <sup>B</sup>	<b>13.8</b>	<b>0.0008</b>
22:6n-3	6.8	±	0.2 <sup>A</sup>	8.9	±	0.1 <sup>B</sup>	13.8	±	0.5 <sup>C</sup>	<b>127.1</b>	<b>0.0000</b>
24:5n-3	0.1	±	0.0 <sup>A</sup>	0.2	±	0.0 <sup>B</sup>	0.2	±	0.0 <sup>B</sup>	<b>11.7</b>	<b>0.0015</b>
24:6n-3	0.0	±	0.0 <sup>A</sup>	1.2	±	0.0 <sup>B</sup>	0.5	±	0.0 <sup>C</sup>	<b>283.0</b>	<b>0.0000</b>
НЖК	21.5	±	0.1 <sup>A</sup>	27.1	±	0.3 <sup>B</sup>	36.4	±	1.0 <sup>C</sup>	<b>167.3</b>	<b>0.0000</b>
МНЖК	44.5	±	0.7 <sup>A</sup>	42.4	±	0.2 <sup>B</sup>	33.5	±	0.8 <sup>C</sup>	<b>81.5</b>	<b>0.0000</b>
ПНЖК	34.0	±	0.7 <sup>A</sup>	30.5	±	0.2 <sup>B</sup>	30.0	±	0.3 <sup>B</sup>	<b>23.9</b>	<b>0.0001</b>

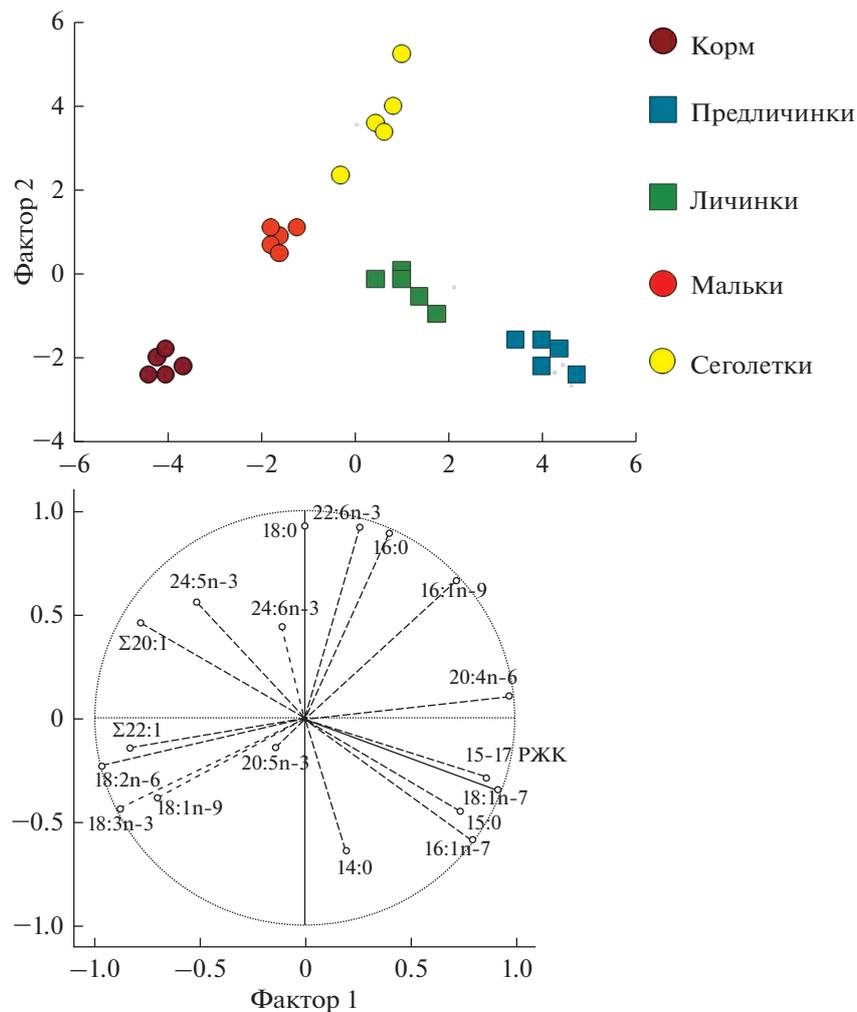
Примечание. F – значения критерия Фишера, p – уровень значимости (достоверные значения выделены жирным шрифтом). Средние, обозначенные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются по критерию LSD (наименьшего значимого различия) Фишера для *post hoc* теста в однофакторном дисперсионном анализе. SE – стандартная ошибка.

в организме молоди осетра в данном исследовании может подтвердить и растущее от стадии предличинки до стадии сеголетка процентное содержание 16:0. Известно, что эта кислота элонгируется и десатурируется до более длинноцепочечных ЖК, которые, по большей части, необходимы для биосинтеза фосфолипидов (Murzina et al., 2012).

С переходом на питание коммерческим кормом, состав ЖК подросшей молоди сибирского осетра значительно изменился. Так, у мальков отмечен рост уровней ЖК – 18:1n-9 и 18:2n-6, которые содержались в большом количестве в составе ЖК корма. Кроме того, ЖК состав мальков и сеголеток отличался высоким содержанием 20:1n-9 и 22:1, источниками которых вероятно стал корм. Повышенное содержание этих ЖК и включение их в состав фосфолипидов может привести к снижению жидкостности (текучести) мембран кле-

ток (Murzina и др., 2012). Для организма сеголетки осетра встраивание данных ЖК в липидный бислой клеточных мембран может снизить возможности адаптации к низкой температуре воды, при условии их выпуска в Енисей в августе–сентябре. Однако, длинноцепочечные моноены, часто в составе ТАГ, утилизируются в качестве источников энергии молодью рыб и не включаются в структурные липиды (Murzina и др., 2012).

Процентное содержание ДГК в биомассе осетра к этапу сеголетки значительно возросло, хотя в составе коммерческого корма содержание этой ЖК значительно ниже. Такая динамика может быть вызвана избирательным накоплением ДГК в составе фосфолипидов клеточных мембран в растущем организме молоди осетра. Нехватка ДГК может вызвать задержку в функциональном развитии мозга и привести к уменьшению скорости



**Рис. 1.** Мультивариантный анализ методом главных компонент жирнокислотного состава (% от суммы ЖК) корма и биомассы молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*), выращенного в аквакультуре. Фактор 1 объясняет 46%, фактор 2 – 29.6%.

плавания, поскольку концентрация этой кислоты, по-видимому, влияет на активность мотонейронов в головном мозге рыб (Benítez-Santana et al., 2014). Кроме того, рост уровня ДГК в биомассе сеголеток мог быть вызван собственным синтезом этой кислоты. Известно, что молодь рыб может обладать повышенной способностью к синтезу ЭПК и ДГК (Henrotte et al., 2011; Asil et al., 2017). Косвенным свидетельством этого может быть значительный рост процента 24:6n-3 – промежуточной ЖК на пути синтеза ДГК из предшественников (Blanchard et al., 2005). Такой рост был отмечен в данном исследовании у осетра на стадии малька.

Что касается АРК и ЭПК, то их уровень на протяжении всего постэмбрионального развития сибирского осетра значительно не менялся. Возможно, большая часть этих ЖК стала субстратом для синтеза липидных медиаторов – эйкозаноидов и простагландинов, влияющих на адаптивные спо-

собности молоди рыб (Cahu et al., 2009; Pederzoli, Mola, 2016).

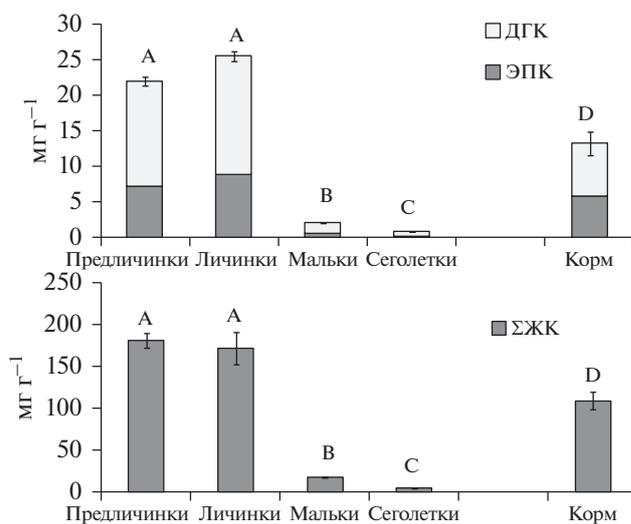
На начальных стадиях постэмбрионального развития молодь осетра отличалась высоким содержанием общих липидов и ЖК в биомассе, которое составляло около 235 и 180 мг г<sup>-1</sup> (сырой массы) соответственно. Данная динамика, вероятно, вызвана накоплением общих липидов в икре производителей осетров, нагуливающихся в естественных условиях в р. Енисей. Наиболее высоким у предличинок и личинок осетра было содержание и ЭПК, и ДГК. Повышенное содержание ПНЖК, и в частности ЭПК и ДГК, в икре и молоди рыб в период эндогенного питания важно для обеспечения выживания и развития молоди рыб на первых этапах постэмбрионального развития. Эти ЖК в период вылупления способствуют адаптации и биомембран клеток к изменению условий среды, а также участвуют в регуляции ряда физиологических про-

цессов в клетках и тканях (Murzina et al., 2012). Отмечено, что в условиях стресса личинки судака предпочитают использовать длинноцепочечные ПНЖК в качестве метаболических субстратов (Abi-Ayad et al., 2004), а их недостаток в организме может привести к шоковому синдрому – внезапной смерти при резком и значительном изменении факторов окружающей среды (Lund et al., 2012).

Стоит отметить, что к стадии малька и сеголетка содержание общих липидов, суммарное содержание ЖК, а также ЭПК и ДГК в биомассе молоди сибирского осетра существенно падало. Ряд данных указывает, что для молоди некоторых видов рыб, для выживания более 50% особей в условиях стресса содержание ДГК в биомассе должно составлять от 1.5 до 2.5 мг г<sup>-1</sup> (Lund et al., 2012; Matsunari et al., 2013). Содержание ДГК в биомассе сеголеток осетра в данном исследовании составило 0.6 мг г<sup>-1</sup>, что меньше указанных выше значений. При низком содержании ДГК в биомассе сеголеток в момент выпуска в естественную среду обитания в стрессовых условиях (смена температурного и кислородного режимов, гидрологических условий) может произойти гибель большого числа сеголеток. Это может снизить эффективность процедуры пополнения естественной популяции осетра в реке Енисей. Однако физиологические и биохимические процессы, происходящие в организме молоди рыб, могут быть видоспецифичны. По этой причине для установления порогового содержания ДГК, необходимого для высокого уровня выживаемости молоди сибирского осетра в стрессовых условиях, необходимы дополнительные экспериментальные исследования.

В составе коммерческого корма, используемого при выращивании молоди осетра, содержание ДГК составляло  $7.4 \pm 1.7$  мг г<sup>-1</sup>, а общее содержание ЖК –  $108.6 \pm 10.3$  мг г<sup>-1</sup>. При этом, содержание ЭПК и ДГК, а также общее содержание ЖК в биомассе молоди осетра у стадии сеголетка значительно падало. Это может быть связано со снижением относительного содержания липидов в растущем организме молоди. Кроме того, большая часть липидов корма могла использоваться в качестве источника энергии в процессе роста и развития и не накапливаться в структурных липидах. Причиной низкого содержания ДГК и ЭПК в биомассе молоди может стать и плохая усвояемость липидов, из-за высокой жирности корма. При высокой концентрации ТАГ в корме происходит обволакивание ворсинок кишечника и вакуолизация энтероцитов, и транспорт ЖК из кишечника в кровь останавливается (Hamre et al., 2011).

Несмотря на низкое содержание в биомассе сеголеток осетра, проценты ДГК и ЭПК относительно других ЖК были достаточно высокими. Однако, имеющихся на данный момент сведе-



**Рис. 2.** Среднее содержание суммы жирных кислот и ЭПК + ДГК ± стандартная ошибка (в мг г<sup>-1</sup> сырой массы) в корме и биомассе молоди сибирского осетра (*Acipenser baerii*), выращенной в аквакультуре. Значения, помеченные одной и той же буквой, не имеют достоверных отличий при  $p < 0.05$  по критерию Фишера для *post hoc* теста в однофакторном дисперсионном анализе.

ний недостаточно, чтобы оценить – является ли уровень установленного содержания ЖК достаточным для полноценного формирования нервной системы, развития моторных реакций, нормального функционирования зрительной и слуховой сенсорных систем, развития адаптивных реакций и обеспечения высокой выживаемости у исследованной молоди сибирского осетра. Для дальнейшего исследования этого вопроса возникает необходимость в экспериментальных работах по оценке выживаемости молоди сибирского осетра.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования было установлено, что ЖК состав биомассы молоди сибирского осетра, выращенного в аквакультуре, в первую очередь связан с ЖК составом их пищевых источников. На этапе эндогенного питания предличинки и личинки осетра отличались повышенными уровнями ЖК-биомаркеров диатомовых водорослей, бактериального и аллохтонного вещества, источниками которых были бентосные организмы, входящие в рацион самок осетра. При переходе на питание коммерческим кормом в биомассе мальков и сеголеток росли уровни ЖК, доминирующих в составе корма. Процент ДГК от стадии предличинки до сеголетка достоверно возрастал, вероятно, за счет избирательного накопления этой ЖК в структурных липидах. Несмотря на низкое содержание ЭПК и ДГК

(мг г<sup>-1</sup>) в биомассе сеголеток сибирского осетра, выращенного на искусственном корме, их высокое процентное содержание может удовлетворять потребности данного вида рыб в этих омега 3 ПНЖК для поддержания необходимого функционального состояния и обеспечивать высокий уровень выживаемости молоди.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.Е. Рудченко – подготовка проб к анализу, проведение анализа состава жирных кислот молоди сибирского осетра, статистический анализ, обсуждение результатов, написание и подготовка публикации; Л.А. Меньшикова – сбор биоматериала, подготовка проб к анализу, обсуждение результатов исследования, подготовка публикации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гадинов А.Н., Крючкова Г.Н. Искусственное воспроизводство осетровых рыб в целях сохранения биоразнообразия ихтиофауны р. Енисей // Вестник КрасГАУ. 2008. № 4. С. 148–154.
- Мурзина С.А., Неведова З.А., Немова Н.Н. Влияние жирных кислот (маркеров пищевых источников) на механизмы адаптации в условиях высоких широт (обзор) // Труды Карельского научного центра РАН. 2012. № 2. С. 18–25.
- Abi-Ayad S.-M.E.-A., Boutiba Z., Melard C. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) // Fish Physiology and Biochemistry. 2004. V. 30. P. 129–136.
- Asil S.M., Kenaria A.A., Miyanjib G.R. et al. The influence of dietary arachidonic acid on growth, reproductive performance, and fatty acid composition of ovary, egg and larvae in an anabantid model fish, Blue gourami (*Trichopodus trichopterus*; Pallas, 1770) // Aquaculture. 2017. V. 476. P. 8–18.
- Benitez-Santana T., Atalah E., Betancor M.B. et al. DHA but not EPA, enhances sound induced escape behavior and Mauthner cells activity in *Sparus aurata* // Physiology & Behavior. 2014. V. 124. P. 65–71.
- Blanchard G., Druart X., Kestemont P. Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* females in relation to hepatic status and gonad maturation // J. Fish Biology. 2005. V. 66. P. 73–85.
- Cahu C., Gisbert E., Villeneuve L. et al. Influence of dietary phospholipids on early ontogenesis of fish // Aquaculture Research. 2009. V. 40. I. 9. P. 989–999.
- Engstrom-Ost J., Lehtiniemi M., Jonasdottir S.H. et al. Growth of pike larvae (*Esox lucius*) under different conditions of food quality and salinity // Ecology of Freshwater Fish. 2005. V. 14. P. 385–393.
- Gladyshev M.I., Kolmakova O.V., Tolomeev A.P. et al. Differences in organic matter and bacterioplankton between sections of the large Arctic river: Mosaic or continuum? // Limnol. Oceanogr. 2015. V. 60. P. 1314–1331.
- Hamre K. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In Larvae Fish // Nutrition. 2011. P. 153–183.
- Henrotte E., Kpogwe D., Mandiki S.N.M. et al. n-3 and n-6 fatty acid bioconversion abilities in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) at two developmental stages // Aquaculture Nutrition. 2011. V. 17. P. 216–225.
- Jalali M.A., Hosseini S.A., Imanpour M.R. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae // Aquaculture Research. 2008. V. 39. P. 1286–1291.
- Kamler E. Resource allocation in yolk-feeding fish // Rev. Fish Biol. Fisheries. 2008. V. 18. P. 143–200.
- Lund I., Skov P.V., Winding Hansen B. Dietary supplementation of essential fatty acids in larval pikeperch (*Sander lucioperca*); short and long term effects on stress tolerance and metabolic physiology // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 2012. V. 162. P. 340–348.
- Luo L., Li A., Liang X. et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids improve the sperm, egg, and offspring quality of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // Aquaculture. 2017. V. 113. P. 246–254.
- Matsunari H., Hashimoto H., Iwasaki T. Effect of feeding rotifers enriched with taurine on the growth and survival of larval amberjack *Seriola lalandi* // Fisheries Science. 2013. V. 79. P. 815–821.
- Mesa-Rodriguez A., Hernandez-Cruz M.C., Beatriz M.B. et al. Effect of increasing docosahexaenoic acid content in weaning diets on survival, growth and skeletal anomalies of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833) // Aquaculture Research. 2018. V. 49. I. 3. P. 1200–1209.
- Montero D., Kalinowski T., Obac A. et al. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health // Aquaculture. 2003. V. 225. P. 353–370.
- Murзина S.A., Nefedova Z.A., Ripatti P.O. et al. Dynamics of fatty acid composition of total lipids during embryonic development of atlantic salmon *Salmo salar* L. // Russian J. Developmental Biology. 2012. V. 43. P. 131–136.
- Napolitano G.E. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems // Lipids in Freshwater Ecosystems / Eds. Arts M.T., Wainman B.C. N.Y.: Springer-Verlag, 1999. P. 21–44.
- Nieminen P., Westenius E., Halonen T. et al. Short communication fatty acid composition in tissues of the farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // Food Chemistry. 2014. V. 159. P. 80–84.
- Pederzoli A., Mola L. The early stress responses in fish larvae // Acta Histochemica. 2016. V. 118. P. 443–449.
- Rønnestad I., Yu M., Ueberschä B. et al. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowl-

- edge, and gaps and bottlenecks in research // *Reviews in Aquaculture*. 2013. V. 5. P. 59–98.
- Sushchik N.N., Gladyshev M.I., Kalachova G.S. et al.* Particulate fatty acids in two small Siberian reservoirs dominated by different groups of phytoplankton // *Freshwater Biology*. 2003. V. 48. P. 394–403.
- Sushchik N.N., Makhutova O.N., Rudchenko A.E. et al.* Comparison of fatty acid contents in major lipid classes of seven Salmonid species from Siberian arctic lakes // *Biomolecules*. 2020. V. 10(3). P. 419.
- Tocher D.R.* Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // *Reviews in Fisheries Science*. 2003. V. 11. № 2. P. 107–184.
- Tocher D.R.* Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish // *Aquaculture Research*. 2010. V. 41. I. 5. P. 717–732.
- Voronin A.P., Murzina S.A., Nefedova Z.A. et al.* A comparative study of lipids and its dynamic during embryogenesis and early post-embryonic development of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*Salmo trutta* L.) // *Russian J. Developmental Biology*. 2021. V. 52. P. 87–96.

## Composition and Content of Fatty Acids in the Biomass of Juveniles Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) in Aquaculture Conditions

A. E. Rudchenko<sup>1, \*</sup> and L. A. Menshikova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Federal University, Svobodnyi ave. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

<sup>2</sup>Yenisei Branch Federal State Budgetary Organization “The Main Basin Department for Fishery and Conservation of Water Biological Resources”, Otdykha 19/3, Krasnoyarsk, 660093 Russia

\*e-mail: arudchenko@sfu-kras.ru

The composition of fatty acids in the biomass of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) grown in aquaculture to supplement the number of sturgeon populations in the Yenisei River was studied. To study the dynamics of fatty acid composition during growth, juveniles were studied at different stages of postembryonic development – in periods of endogenous and exogenous nutrition. It was found that the food source has a significant influence on the composition of fatty acids in the juvenile biomass. Saturated and monounsaturated fatty acids are used by juvenile Siberian sturgeon as energy sources for growth and development. Polyunsaturated fatty acids and docosahexaenoic acid (DHA) tended to accumulate in biomass from the prelarva stage to the underyearling stage. The content of eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA (mg g<sup>-1</sup>) significantly decreases towards the underyearling stage due to a decrease in the total content of fatty acids in the biomass of juvenile sturgeon. However, the levels of EPA and DHA in the biomass of Siberian sturgeon underyearlings before release into their natural habitat were relatively high, which may contribute to the development of the necessary adaptive responses and a high survival rate of juveniles.

**Keywords:** Siberian sturgeon, fatty acids, lipids, postembryonic development, aquaculture

## РАННИЕ ЭТАПЫ ЭВОЛЮЦИИ МЕЗОДЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. Н. Д. Озернюк<sup>а, \*</sup>, В. В. Исаева<sup>б, с</sup><sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия<sup>б</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,  
ул. Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия<sup>с</sup>Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Национального научного центра морской биологии ДВО РАН,  
ул. Пальчевского, 17, Владивосток, 690059 Россия

\*e-mail: ozernyuk@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

Секвенирование геномов одноклеточных эукариот Holozoa (*Monosiga brevicollis*, *Capsaspora owczarza-kii*), базальных многоклеточных Porifera и Cnidaria, а также Bilateria показало, что генный репертуар и генные регуляторные сети, играющие ключевую роль в эволюции многоклеточных животных, в частности, в формировании мезодермы, имеют более раннее происхождение, чем предполагалось. Появление Cnidaria и Bilateria, произошло накануне Кембрийского взрыва, когда эволюционировало небывалое количество новых форм организмов. Предполагается, что молекулярно-генетическая основа Кембрийского взрыва была подготовлена *Нох*-генами, которые обеспечили принципиальное усложнение генетических программ развития Bilateria (Erwin, Davidson, 2002; Davidson, 2006; Carroll, 2008; Holland, 2015).

**Ключевые слова:** мезодерма, книдарии, Bilateria, генный репертуар, сигнальные пути, генные регуляторные сети, *Нох*-гены, Кембрийский взрыв

DOI: 10.31857/S0475145022020094

## ВВЕДЕНИЕ

Зародышевые листки, формирующие план строения многоклеточных животных, впервые были описаны Карлом фон Бэрмом. В конце XIX в. впервые были описаны телобласты – стволовые клетки мезодермы. Имевшее место формирование элементов мезодермы на ранних этапах эволюции Metazoa, было крупномасштабным эволюционным новшеством – ароморфозом, изменившим характер индивидуального развития животных. Впервые мезодермальный листок у Bilateria формируется у плоских червей Plathelminthes (600–550 млн лет назад) из телобластов в заднем конце зародыша, которые дают начало соединительной ткани, заполняющей пространство между внутренними органами (Иванова-Казас, 1995; Рупперт и др., 2008; Salinas-Saavedra et al., 2018). Поскольку производными мезодермы являются мышечная, скелетная, кровеносная, половая и выделительная системы (Technau, Scholz, 2003), целомический эпителий, то формирование мезодермы стало источником интенсивных эволюционных преобразований. Переход от двуслойных животных к трехслойным билатерально-симметричным организмам и возникновение мезодермы связано с эволюцией осевой симметрии плана строения

Metazoa (Technau, Scholz, 2003; Isaeva, Kasyanov, 2021). В онтогенезе Bilateria мезодерма появляется в процессе гастрюляции.

Анализ геномов двуслойных Metazoa и представителей Bilateria показал, что генный “инструментарий”, характерный для билатерально-симметричных животных, появился на достаточно ранних этапах эволюции. Эта особенность касается в первую очередь эволюционного происхождения мезодермы. В последние десятилетия появились основания констатировать, что качественная сторона генного репертуара, охватывающая большинство признаков Bilateria, была уже сформирована у одноклеточных эукариот (хоанофлагеллята *Monosiga brevicollis*, филастерия *Capsaspora owczarza-kii*), а также у Porifera. Использование современных методов анализа регуляции процессов развития, прежде всего, секвенирования геномов, биоинформатических подходов, генных регуляторных сетей и сигнальных путей, дало возможность проследить наиболее ранние этапы появления генов, определяющих формирование элементов мезодермы (Martindale et al., 2004; Putnam et al., 2007; Erwin, 2009; Technau, 2010; Hashimshony et al., 2015; Röttinger et al., 2012; Srivastava, 2015; Technau et al., 2015; Steinmetz et al.,

2017; Wijesena et al., 2017; Erwin, 2020; Ros-Rocher et al., 2021). Анцестральные функции этих генов связаны, по-видимому, с контролем процессов гаструляции и/или дифференцировки энтометодермы, а анцестральные генные сети у Bilateria были рекрутированы, вероятно, для дифференцировки мезодермы, в частности, процессов миогенеза (Technau, 2010). Очевидно, что анализ этой проблемы существенно осложняется отсутствием информации о строении последнего общего предка двуслойных Metazoa и Bilateria, а также общего предка Bilateria. Поэтому данные об эволюционных предпосылках происхождения мезодермы, имеющихся у Cnidaria, можно использовать только для осторожной экстраполяции на Bilateria.

### ГЕННЫЙ РЕПЕРТУАР

Обнаружение раннего эволюционного появления генных ресурсов, необходимых для образования мезодермы, стало возможным после секвенирования геномов одноклеточных эукариотических организмов, губок и представителей двуслойных Metazoa. В частности, уже у одноклеточных хоанофлагеллят *Monosiga* и филастерий *Capsaspora* при секвенировании геномов были идентифицированы гены, ортологичные генам Metazoa, которые кодируют ряд транскрипционных факторов, а также гены, кодирующие белки клеточной адгезии, внеклеточного матрикса и некоторых сигнальных путей (Erwin, 2009, 2020; Suga et al., 2013). Характерные для Bilateria гены, кодирующие транскрипционные факторы, выявлены также у губки *Amphimedon queenslandica* и трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (Placozoa) (Srivastava, 2008; Erwin, 2009, 2020). Речь идет о генах, которые кодируют транскрипционные факторы классов ANTP, Pax, POU, T-box, Sox, Mef2, PRD.

Из анализа геномов Cnidaria из класса Anthozoa (*Nematostella* и *Acropora*) следует, что их генный “инструментарий”, включая генные регуляторные сети, оказывается во многом общим с Bilateria, а его элементы возникли на ранних этапах эволюции многоклеточных (Putnam et al., 2007; Srivastava, 2008, 2015; Technau, 2010; Hashimshony et al., 2015; Technau et al., 2015; Steinmetz et al., 2017; Wijesena et al., 2017). Первоначально у актинии *Nematostella vectensis* было обнаружено не менее семи генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые участвуют в дифференцировке мезодермы Bilateria (Erwin, 2009). В области бластопора *Nematostella* экспрессируются гены *brachyury*, *goosecoid* и *forkhead*, а в энтодерме — *snail* и *twist*. Генные регуляторные сети, содержащие эти гены, принимают участие и в регуляции дифференцировки мезодермы (в частности, миогенеза) у Bilateria (Technau, Scholz, 2003; Technau, 2010). В геноме *Nematostella* обнаружены также гены, участвующие в детерминации дорсо-вентраль-

ной оси у Bilateria. Это гены *decapentaplegic (dpp)*, *chordin* и некоторые другие (Technau, 2010; Technau et al., 2015). О масштабах этого сходства свидетельствуют данные о том, что у *Nematostella* было выявлено несколько десятков транскрипционных факторов, свойственных билатерально-симметричным животным (Ryan et al., 2007; Erwin, 2009). Следует отметить, что генный репертуар, определяющий процессы развития исследованных Metazoa, оказался общим, несмотря на огромное разнообразие планов строения этих животных (Erwin, 2009).

Более детальная информация о молекулярно-генетических основах появления предшественников мезодермы была получена при сравнении профилей экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы в зародышевых листках Cnidaria и Bilateria (Steinmetz et al., 2017). В частности, обнаружено, что в энтодерме Cnidaria (на примере *Nematostella*) синтезируются транскрипционные факторы, свойственные как энтодерме, так и мезодерме билатерально-симметричных животных. В геноме этого вида были выявлены транскрипционные факторы, характерные для мезодермы представителей Bilateria: в висцеральной мезодерме это гены *foxC*, *nkx3*, *Six4/5*; в скелетных мышцах билатерий — *eyes*, *six1/2*, *six4/5*, *dachshund*; в сердечной мышце билатерий — *nk4*, *gata4/5*; *tbx4/5*; *tbx1/10*, *mef2*; в сомитах позвоночных — *paraxis*, *twist*, *mox*. Энтодерму Cnidaria эти авторы называют “мезэнтодермой”, указывая на наличие в данном зародышевом листке этих животных молекулярных маркеров мезодермы (Steinmetz et al., 2017). Следует также отметить, что сравнение геномов Cnidaria и отдельных ветвей билатерально-симметричных животных показало большее сходство геномов *Nematostella* с позвоночными, чем с геномами нематоды *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* (Putnam et al., 2007; Levinton, 2008; Technau, 2010).

Для изучения филогенетического возраста зародышевых листков — временной последовательности их формирования в ходе эволюции, в качестве модели было предложено использовать данные о последовательности экспрессии экзо- и энтодермальных маркерных генов в процессе развития нематоды *Caenorhabditis elegans*, а также лягушки *Xenopus tropicalis*, актинии *Nematostella vectensis* и губки *Amphimedon queenslandica* (Hashimshony et al., 2015). Ортологи “энтодермальных” генов экспрессируются у этих видов раньше, чем ортологи “эктодермальных” генов. Таким образом, наиболее древними оказались “энтодермальные” гены, которые возникли, предположительно, до образования Metazoa (Hashimshony et al., 2015). Сформировавшийся в тот период “энтодермальный” генный репертуар сохранил, вероятно, и “мезодермальные” гены, поскольку другой путь их появления в процессе эволюции представляется менее вероятным.

## НОХ-ГЕНЫ

В регуляции онтогенетических процессов, в том числе формировании зародышевых листков у *Bilateria* на уровне спецификации и паттернирования, ведущая роль принадлежит гомеозисным генам. К этой группе относятся гены класса ANTP, осуществляющие разметку различных областей развивающихся зародышей вдоль антерио-постериорной оси тела. Речь идет об осевых структурах, прежде всего, сегментации тела и формировании конечностей. Гены группы ANTP, в состав которой входят *Hox*-гены, а также *ParaHox*- и *NK*-гены, появились, как предполагается, до Кембрийского взрыва у общего предка *Cnidaria* и *Bilateria*. Генетическая основа Кембрийского взрыва была подготовлена, как предполагается, гомеозисными генами за счет значительного увеличения их числа в кластере (Davidson, 2006; Laroux et al., 2008; Erwin, 2009; Holland, 2015).

Предполагается, что образование паралогичных кластеров *Hox*-, *ParaHox*- и *NK*-генов на регуляторном уровне послужило генетической основой образования и дивергенции билатерально-симметричных животных (Holland, 2001; Minelli, 2003; Davidson, 2006). Эти три группы гомеозисных генов в различной степени представлены в отдельных ветвях *Bilateria* (Ferrier, 2010). Таким образом *Hox*-гены – аппарат региональной идентификации морфогенетических процессов вдоль антериор-постериорной оси у *Bilateria* появился задолго до формирования этих организмов. Предполагается, что *Hox*-гены появились в результате тандемных дупликаций одного предкового гена *ProtoHox* (Holland, 2015). Для *Hox*-генов многих *Metazoa*, характерна пространственная и временная колинеарность экспрессии вдоль антериор-постериорной оси (Tschopp, Duboule, 2011; Mallo, Alonso, 2013).

Существенно, что в будущей закладке параксиальной мезодермы *Bilateria* происходит активация экспрессии *Hox*-генов, которая осуществляется при помощи разных механизмов: BMP- и Wnt-сигналинга, а также транскрипционных факторов *Cdx* (Alexander et al., 2009; Tschopp, Duboule, 2011; Mallo, Alonso, 2013). Экспрессия *Hox*-генов на начальных этапах сомитогенеза активируются при помощи ретиноевой кислоты и Fgf-сигналинга. В регуляции экспрессии *Hox*-генов у *Bilateria* участвуют также эпигенетические механизмы.

Гомеозисные гены, прежде всего, *Hox*-гены, были обнаружены и у представителей *Cnidaria*: *Anthozoa* (*Nematostella*, *Aiptasia*) и *Hydrozoa* (*Clytia*, *Chlorohydra*) (Schummer et al., 1992; Finnerty, Martindale, 1997; Ryan et al., 2007; Finnerty et al., 2004; Chiori et al., 2009; Genikhovich, Technau, 2017; DuBuc et al., 2018; He et al., 2018; Rentsch, Holdstein, 2018). Кластеры *Hox*-генов появились, как

предполагается (Ryan et al., 2007), до эволюционного расхождения *Cnidaria* и *Bilateria* 570–700 млн лет назад (Ryan et al., 2007). Количество *Hox*-генов у *Cnidaria*, как и у *Bilateria*, определяется соотношением дупликаций этих генов и их потерь (Ryan et al., 2007; DuBuc et al., 2018).

Следует отметить, что *Nematostella*, кроме орально-аборальной, обладает направительной осью и элементами билатеральной симметрии (билатеральным расположением септ и мезентериальных мышечных валиков), скрадываемыми радиальной симметрией шупалец. Вывод о билатеральности *Anthozoa* был подтвержден данными об асимметричной экспрессии ряда генов (*Nvdpp*, *Nvchd*) у *Nematostella* (Genikhovich, Technau, 2017). Обычно функция региональной идентификации вдоль антерио-постериорной оси тела ассоциируется с *Bilateria*. Однако приведенные выше данные об элементах билатеральной симметрии у *Nematostella*, а также обнаружение нескольких *Hox*-генов у представителей *Cnidaria* привели к исследованиям роли *Hox*-генов в паттернировании этих животных (Finnerty, Martindale, 1997; Jakob, Schierwater, 2007; Ryan et al., 2007; Chiori et al., 2009; DuBuc et al., 2012, 20018; Genikhovich, Technau, 2017; He et al., 2018; Rentsch, Holstein, 2018).

Если у *Bilateria* *Hox*-гены паттернируют антериор-постериорную ось, то активность *Hox*-генов у *Cnidaria* (*Anthozoa*) обеспечивает разметку орально-аборальной и направительной оси (Finnerty, Martindale, 1997; Ryan et al., 2007; Genikhovich, Technau, 2017; DuBuc et al., 2018; He et al., 2018; Rentsch, Holstein, 2018). Первоначально у *Nematostella* было обнаружено пять *Hox*-генов (Finnerty, Martindale, 1997). В этой работе поиск *Hox*-генов проводился на базе последовательностей, полученных при помощи ПЦР-анализа. Впоследствии при анализе на основе полного секвенирования генома этого вида *Cnidaria* было проанализировано три *Hox*-гена – *Hox1*, *Hox2* и *Hox9* (Ryan et al., 2007). Эти гены экспрессируются вдоль орально-аборальной оси *Nematostella*. Авторы данной работы делают также вывод о том, что *Hox*-гены участвовали в паттернировании как первичной, так и вторичной осей тела у общего предка *Cnidaria* и *Bilateria*. Поскольку основная функция *Hox*-генов *Cnidaria* сводится к паттернированию орально-аборальной оси тела, был необходим анализ экспрессии этих генов в разных зонах зародыша на ранних стадиях развития (Ryan et al., 2007).

На следующем этапе анализа роли этих генов в морфогенезах *Cnidaria* как сестринской группы *Bilateria* было предложено выделить *Hox*-гены антериорного и центрального/постериорного отделов по аналогии с *Bilateria* (DuBuc et al., 2018). В геноме *Nematostella* авторы выделяют гены *Hox1* (*NvAx6*) и *Hox2* (*NvAx7* и *NvAx8*), а также четыре дополнительных гена: центральных/постериорных

*NvAx1*, и *NvAx1a*, anteriор-подобного *Hox*-гена (*NvAx6a*) и псевдогена (*NvAx9*). Состав *Hox*-кластеров в геномах разных групп кишечнополостных показывает, что этот кластер у Anthozoa имеет относительно целостную структуру в отличие от фрагментированных кластеров у представителей других классов этих животных (Genikhovich, Technau, 2017; DuBuc et al., 2018; He et al., 2018; Rentsch, Holstein, 2018).

*Hox*-гены (*NvAx6*) и (*NvAx1*) патернируют орально-аборальную ось, поэтому анализ их экспрессии важен для понимания особенностей регуляции морфогенеза структур, участвующих в формировании данной оси. Применение гибридизации *in situ* на стадии бластулы *Nematostella* показало, что *Hox* (*NvAx6*) экспрессируется в презумптивной оральной части зародыша, а *Hox* (*NvAx1*) – в презумптивной аборальной части (Rentsch, Holstein, 2018). Эктопическая экспрессия аборального *Hox* (*NvAx1*) ограничивает гастрюляцию и спецификацию оральной части зародыша, что вызывает остановку формирования энтомерозодермы, а нокдаун орального *Hox* (*NvAx6*) приводит к серьезным дефектам гастрюляции и экспансии транскриптов гена (*NvAx1*), что тормозит развитие оральной части зародыша (DuBuc et al., 2018). *Hox*-гены (*NvAx6*) и (*NvAx1*) патернируют формирование орально-аборальной оси у Cnidaria через Wnt-сигналинг начиная с ранних стадий гастрюляции и последующего личиночного развития (Genikhovich, Technau, 2017; DuBuc et al., 2018; He et al., 2018; Rentsch, Holstein, 2018).

## СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

Теоретические концепции морфогенетических полей и организаторов как интегральных факторов, контролирующих план строения и регуляторные способности развивающегося организма, подтверждены данными о молекулярных носителях позиционной информации, функционирующих как морфогены-организаторы осевого плана строения животных, и тем самым переведены на язык молекулярной биологии и генетики (Niehrs, 2010; Neijts et al., 2016; Bier, De Robertis, 2015; Lapraz et al., 2015; Arias, Steventon, 2018; Isaeva, Kasyanov, 2021). Позиционная информация, обеспечиваемая сигнальными системами Wnt, BMP, Nodal, Hedgehog, играет ключевую роль в раннем развитии Metazoa, определяя осевой план строения организма и различия судьбы клеток в зависимости от их положения в системе эмбриона (DuBuc et al., 2012, 2018; Neijts et al., 2016; Dunn et al., 2017; Hogvall et al., 2019; Erwin 2020; Fields, Levin, 2020).

Показано, что организатор Шпеманна (Spemann, Mangold, 1924) и подобные ему центры зародышей позвоночных на стадии гастрюлы функционируют как источник “коктейля” различных моле-

кул сигнальных путей; помимо лигандов (Wnt, BMP и Nodal), синтезируется набор их рецепторов, антагонистов и транскрипционных факторов (Niehrs, 2010; Cavalieri, Spinelli, 2015; Lowe et al., 2015; Anderson, Stern, 2016; Arias, Steventon, 2018; Omori et al., 2018; Yasuoka, Taira, 2019). Эмбриональные структуры, подобные организатору Шпеманна, были найдены не только у зародышей позвоночных, но также у иглокожих, представителей первичноротых животных и кишечнополостных (Stern et al., 2006; Kraus et al., 2007, 2016; Bier, De Robertis, 2015; Cavalieri, Spinelli, 2015; Lapraz et al., 2015; Genikhovich, Technau, 2017; Arias, Steventon, 2018). Например, клетки губы бластопора кишечнополостных, развивающегося в оральный регион полипа, гомологичный гипостому гидры, подобно организатору Шпеманна у амфибий, экспрессируют лиганды Wnt и *brachyury* (см. Genikhovich, Technau, 2017).

Формирование при гастрюляции организационного центра, экспрессирующие Wnt и определяющего ориентацию первичной оси у изученных представителей Deuterostomia, Protostomia, кишечнополостных и губок, свидетельствует о консерватизме этого сигнального пути, лежащего в основе поляризованного развития всех Metazoa (Holstein, 2012; DuBuc et al., 2018). На полюсе, специфицируемом сигналом Wnt высокой интенсивности, формируется бластопор (при наличии), и этот же полюс становится задним, оральным (у кишечнополостных) или апикальным (у губок) полюсом первичной оси (Loh et al., 2016; Dunn et al., 2018; Hogvall et al., 2019). Таким образом, организатор Шпеманна и подобные ему структуры гастрюлы Metazoa, создают координатную систему позиционной информации, пространственная асимметрия которой транслируется в морфологически различные структуры развивающегося организма (Stern et al., 2006; Bier, De Robertis, 2015; Cavalieri, Spinelli, 2015; Lowe et al., 2015; Owlarn, Bartscherer, 2016). Получены свидетельства взаимосвязи различных сигнальных путей и регуляторных каскадов, формирующих генетические регуляторные сети, которые обладают и консерватизмом, и пластичностью, что обеспечивает способность системы к саморегуляции и преобразованиям (Bertrand et al., 2015; Cavalieri, Spinelli, 2015; Lapraz et al., 2015; Erwin, 2020).

Лабораторные эксперименты с применением ключевых молекул сигнальных путей, продуцируемых организаторами, либо с подавлением активности таких молекул, подтвердили их морфогенетическую эффективность. Например, ингибирование сигнализации Wnt у ранних зародышей позвоночных животных приводило к образованию лишь “обрубка” тела, состоящего из головы и передней части туловища; нокдаун  $\beta$ -катенина (внутриклеточного эффектора, регулирующего транскрипцию генов-мишеней сигнального каскада Wnt) блокировал гастрюляцию и все последующее развитие (см. Martin, Kimelman, 2009). Инъекция

смеси плазмид, содержащих *Wnt1* и *Wnt3*, в бластомеры на стадии 8 или 16 клеток зародыша книдарий *Nematostella*, вызывала образование эктопической оси у 50% первичных полипов (Kraus et al., 2016).

Архетипическое строение Bilateria характеризуется переднезадней, дорсовентральной и лево-правой осями тела; сигнальные пути Wnt и BMP специфицируют основные оси тела, переднезаднюю и дорсовентральную, создавая ортогональную Декартову систему координат плана строения (Stern et al., 2006; Niehrs, 2010; Holland, 2015). Лево-правая симметрия/асимметрия, весьма обычная у билатеральных животных, контролируется сигнальными системами Nodal и Hedgehog (Niehrs, 2010; Holstein, 2012; Bertrand et al., 2015; Loh et al., 2016; Cavodeassi et al., 2019; Fields, Levin, 2020). Таким образом, разнообразие форм животного мира, насколько можно судить, базируется на небольшом числе сигнальных путей, общих для всех основных типов Metazoa (обзоры Niehrs, 2010; Holstein, 2012; Hogvall et al., 2019; Isaeva, Kasyanov, 2021).

У билатеральных животных векторная позиционная информация вдоль переднезадней оси развивающегося организма специфицируется машинерией временной и пространственной экспрессии генов *Hox*-кластера в координации с сигнализацией Wnt и генами *ParaHox*-кластера — системой, наиболее совершенной и досконально исследованной у позвоночных (Deschamps, Duboule, 2017; DuBuc et al., 2018; Ferrier, 2019; Erwin, 2020; Zhong et al., 2020).

У книдарий патернирование орально-аборальной оси осуществляется *Hox*-генами, взаимодействующими с Wnt-сигналингом (DuBuc et al., 2018; He et al., 2018; Rentsch, Holstein, 2018). У *Nematostella* в этом процессе участвуют гены *NvWnt1*, *NvWnt3*, *NvWnt4* и *NvWntA*, экспрессирующиеся на оральном полюсе вокруг бластопора (DuBuc et al., 2018). Нокдаун *Hox (NvAx6)* и *Hox (NvAx1)* приводит к ингибированию экспрессии этих *NvWnt*. Не входящий в эту группу ген *NvWnt2* экспрессируется вдоль средней линии эктодермы зародыша и служит маркером оральной и аборальной территорий. Нокдаун *Hox (NvAx6)* приводит к смещению экспрессии *NvWnt2* в сторону орального полюса, тогда как оверэкспрессия *NvAx6* не влияет на экспрессию *NvWnt2* (DuBuc et al., 2018). Авторы предполагают, что *NvWnt2* служит промежуточным звеном между границей эктодермальных орально-аборальных *Hox*-генов и территорией экспрессии *Wnt*. В процессе гаструляции и последующего развития планулы включается Wnt/ $\beta$ -катенин сигналинг, патернирующий орально-аборальную ось. В это время Vmp агонисты/антагонисты активируют *Hox* гены в энтомезодермальном слое вдоль вторичной оси. Патернирование напри-

вительной оси зародышей Anthozoa, названное аксиальным *Hox*-кодом, также осуществляется *Hox*-генами с участием BMP сигналинга (гена *Gbx*) (He et al., 2018).

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ МЕЗОДЕРМЫ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

При анализе функциональных особенностей клеток энтодермального слоя у Cnidaria было обнаружено определенное сходство как с энтодермой, так и с мезодермой Bilateria (Seipel, Schmidt, 2005, 2006; Steinmetz et al., 2017). В контексте эволюционного происхождения мезодермы следует отметить, что у Cnidaria (на примере Anthozoa и Medusozoa) энтодерма состоит из разных типов клеток, которые обладают несколькими функциями, в частности, функциями мышечной и половой систем, а также экзокринной и инсулинэргической функциями, которые у Bilateria имеют мезодермальное происхождение (Seipel, Schmid, 2006; Schmidt-Rhaesa, 2007; Steinmetz et al., 2017). Приведенные данные дают основание говорить о бифункциональности клеток энтодермы у Cnidaria (Steinmetz et al., 2017).

Формирование мезодермы на уровне клеток сводилось, вероятно, к обособлению от энтодермы (энтомезодермы) клеток миогенной природы, которые рассматриваются как древнейшие производные мезодермы (Rieger, Ladurner, 2003; Schmidt-Rhaesa, 2007). Сегрегация миогенных клеток происходила в районе бластопора и эти клетки вовлекались в дифференцировку, которую можно, вероятно, назвать первичной мезодермальной (Technau, Scholz, 2003; Burton, 2008).

Предполагается, что свободные мышечные клетки произошли в процессе эволюции от миоэпителия, встречающегося как у Cnidaria, так и у Protostomia и Deuterostomia (Burton, 2008). Таким образом, мезодерма Bilateria, по-видимому, берет свое начало от бифункциональной энтомезодермы Cnidaria (Technau, Scholz, 2003; Rieger, Ladurner, 2003; Schmidt-Rhaesa, 2007; Burton, 2008; Steinmetz et al., 2017; Wijesena et al., 2017). Предложена модель гомологов зародышевых листков книдарий, в которой их глоточная эктодерма соответствует энтодерме Bilateria, а энтодерма книдарий гомологична мезодерме этих животных (Steinmetz et al., 2017).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование в процессе эволюции “мезодермального” генного репертуара, свойственного Bilateria, у одноклеточных эукариот, Porifera и Cnidaria послужило важным звеном при анализе происхождения мезодермы, появление которой обеспечило стремительное увеличение видового разнообразия. Обсуждается возможность, того, что общий предок Cnidaria и Bilateria уже имел генный инструмента-

рий, потенциально способный контролировать онтогенез билатерально-симметричных животных с их специфическими особенностями: трехслойностью, билатеральностью, глубокой специализацией отдельных клеточных типов, внутри- и межклеточной сигнализацией и др. (Putnam et al., 2007; Levinton, 2008; Erwin, 2009; Hashimshony et al., 2015; Steinmetz et al., 2017; Srivastava, 2015; Burke, 2021). Важный аспект этой проблемы связан с попытками определения времени появления “мезодермального” генного репертуара в процессе эволюции. Предполагается, что он появился накануне Кембрийского взрыва, когда появились *Hox*-гены, обеспечивающие большое разнообразие планов строения видов (Larroux et al., 2008; Erwin, 2009; Holland, 2015; Srivastava, 2015; Annunziata et al., 2019; Burke, 2021).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00346).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. Санкт-Петербург: Наука, 1995. 566 с.
- Руннерт Э.Э., Фокс Р.С., Барнс Р.Д. Зоология беспозвоночных: Функциональные и эволюционные аспекты. Т. 1. Протисты и низшие многоклеточные. М.: Издательский дом “Академия”, 2008. 496 с.
- Alexander T., Nolte C., Krumlauf R. *Hox* genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009. V. 25. P. 431–456.
- Anderson C., Stern C.D. Organizers in development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. V. 117. P. 435–454.
- Annunziata R., Andrikou R., Perillo M. et al. Development and evolution of gut structures: from molecules to function // *Cell Tissue Res.* 2019. V. 377(3). P. 445–458.
- Arias A.M., Steventon B. On the nature and function of organizers // *Development.* 2018. V. 145. dev159525. <https://doi.org/10.1242/dev.159525>
- Bagaeva T.S., Kupaeva D.O., Vetrova A.O. et al. cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan // *Dev. Biol.* 2019. V. 456. P. 145–153.
- Bertrand S., Aldea D., Oulion S. et al. Evolution of the role of RA and FGF signals in the control of somitogenesis in chordates // *PLoS One.* 2015. V. 10(9). P. e0136587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136587>
- Bier E., De Robertis E.M. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning // *Science.* 2015. V. 348. Issue 6242. aaa5838. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5838>
- Bridge D., Cunningham C.W., De Salle R. et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence // *Mol. Biol. Evol.* 1995. V. 12. P. 679–689.
- Broun M., Sokol S., Bode H.R. *Cngsc*, a homologue of *gooseoid*, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra* // *Development.* 1999. V. 126. P. 5245–5254.
- Broun M., Bode H.R. Characterization of the head organizer in hydra // *Development.* 2002. V. 129. P. 875–884.
- Burke A.C. Shifting the black box: Approaches to the development and evolution of vertebrate mesoderm // *Evol. Dev. Biol.* 2020.
- Burton P.M. Insights from diploblasts; the evolution of mesoderm and muscle // *J. Exp. Zool.* 2008. V. 310B. № 1. P. 5–14.
- Cavaliere V., Spinelli G. Symmetry breaking and establishment of dorsal/ventral polarity in the early sea urchin embryo // *Symmetry.* 2015. V. 7. P. 1721–1733.
- Cavodeassi F., Creuzet S., Etchevers H.C. The hedgehog pathway and ocular developmental anomalies // *Human Genet.* 2019. V. 138. P. 917–936.
- Chiori R., Jager M., Wincher P. et al. Are *Hox* genes ancestrally involved in axial patterning? // *PLoS One.* 2009. V. 4. e4231.
- Davidson E.H. *The Regulatory Genome: Gene Regulatory Network in Development and Evolution.* San Diego. Acad. Press, 2006. 304 p.
- Deschamps J., Duboule D. Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the *Hox* clock // *Genes Devel.* 2017. V. 31. P. 1406–1416.
- DuBuc T.Q., Ryan J.F., Shinzato C. et al. Coral comparative genomics reveal expanded *Hox* cluster in the cnidarian-bilaterian ancestor // *Integr. Comp. Biol.* 2012. V. 52. P. 835–841.
- DuBuc T.Q., Stephenson T.B., Rock A.Q. et al. *Hox* and *Wnt* pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation // *Nature Commun.* V. 22. № 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-04184>
- Dunn F.S., Liu A.G., Donoghue P.C.J. Ediacaran developmental biology // *Biol. Rev.* 2018. V. 93(2). P. 914–932. <https://doi.org/10.1111/brv.12379>
- Erwin D.H. Early origin of the bilaterian developmental toolkit // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2009. V. 364. P. 2253–2261.
- Erwin D.H. The origin of animal body plans: a view from fossil evidence and the regulatory genome // *Development.* 2020. V. 147. dev182899. <https://doi.org/10.1242/dev.182899>
- Ferrier D.E.K. Evolution of *Hox* complexes // *Hox Genes: Studies from the 20th to the 21st Century* / Ed. Deutsch J.S. N.Y.: Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, 2010. P. 91–98.
- Ferrier D.E.K. Space and time in *Hox/ParaHox* gene cluster evolution // *Perspectives on Evolutionary and Develop-*

- mental Biology. Essays for Alessandro Minelli / Ed. Fusco G. Padova: Padova University Press, 2019. P. 245–258.
- Fields C., Levin M.* Does regeneration recapitulate phylogeny? Planaria as a model of body-axis specification in ancestral eumetazoa // *Comm. Integrat. Biol.* 2020. V. 13. P. 27–38.
- Finnerty J.R., Martindale M.Q.* Homeoboxes in sea anemones (Cnidaria: Anthozoa): a PCR-based survey of *Nematostella vectensis* and *Metridium senile* // *Biol. Bull.* 1997. V. 193. P. 62–76.
- Finnerty J.R., Pang K., Burton P. et al.* Origin of bilateral symmetry: Hox and Dpp expression in a sea anemone // *Science.* 2004. V. 304. P. 1335–1337.
- Genikhovich G., Technau U.* On the evolution of bilaterality // *Development.* 2017. V. 144. P. 3392–3404.
- Hashimshony T., Feder M., Levin M. et al.* Spatiotemporal transcriptomic reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer // *Nature.* 2015. V. 519(7542). P. 219–222.
- He S., Del Viso F., Chen C.Y. et al.* An axial Hox code controls tissue segmentation and body patterning in *Nematostella vectensis* // *Science.* 2018. V. 361(6409). P. 1377–1380.
- Hogvall M., Vellutini B.C., Martín-Durán J.M. et al.* Embryonic expression of priapulid Wnt genes // *Devel. Genes. Evol.* 2019. V. 229. P. 125–135.
- Holland P.W.H.* Beyond the box: how widespread is homeobox gene clustering? // *J. Anat.* 2001. V. 199. P. 13–23.
- Holland P.W.H.* Did homeobox gene duplications contribute to the Cambrian explosion? // *Zool. Lett.* 2015. <https://doi.org/10.1186/s40851-014-0004-x>
- Holstein T.W.* The evolution of the Wnt pathway // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. a007922. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007922>
- Isaeva V.V., Kasyanov N.V.* Symmetry transformations in metazoan evolution and development // *Symmetry.* 2021. V. 13. 160. <https://doi.org/10.3390/sym13020160>
- Jakob W., Schierwater B.* Changing hydrozoan bauplans by silencing Hox-like genes // *PLoS One.* 2007. V. 2(8). P. e694.
- Kraus Y., Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Technau U.* The blastoporal organizer of a sea anemone // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. R874–R876.
- Kraus Y., Aman A., Technau U., Genikhovich G.* Pre-bilaterialian origin of the blastoporal axial organizer // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 11694. P. 1–9.
- Kusserow A., Pang K., Sturm C. et al.* Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone // *Nature.* 2005. V. 433. P. 156–160.
- Lapraz F., Haillot E., Lepage T.* A deuterostome origin of the Spemann organizer suggested by Nodal and ADMPS functions in Echinoderms // *Nature Comm.* 2015. 6:8434. [www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications). <https://doi.org/10.1038/ncomms9434>
- Laroux C., Luke G.N., Koopman P. et al.* Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes // *Mol. Biol. Evol.* 2008. V. 25. P. 980–996.
- Loh K.M., van Amerongen R., Nusse R.* Generating cellular diversity and spatial form: Wnt signaling and the evolution of multicellular animals // *Develop. Cell* 2016. V. 38. P. 643–655.
- Lowe C.J., Clarke D.N., Medeiros D.M. et al.* The deuterostome context of chordate origins // *Nature.* 2015. V. 520. P. 456–465.
- Lee P.N., Pang K., Matus D.Q. et al.* A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians // *Cell Dev. Biol.* 2006. V. 17. P. 157–167.
- Levinton J.S.* The Cambrian explosion: How do we use the evidence? // *BioScience.* 2008. V. 58. P. 855–864.
- Mallo M., Alonso C.R.* The regulation of Hox gene expression during animal development // *Development.* 2013. V. 140. P. 3951–3963.
- Martin B.L., Kimelman D.* Wnt signaling and the evolution of embryonic posterior development // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. P. R215–R219.
- Martindale M.Q., Pang K., Finnerty J.R.* Investigating the origin of triploblasty: “mesodermal” gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa) // *Development.* 2004. V. 131. P. 2463–2474.
- Matus D.G., Pang K., Marlow H. et al.* Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development // *PNAS USA.* 2006. V. 103. P. 11195–11200.
- Minelli A.* The Development of Animal Form. Ontogeny, Morphology, and Evolution. Cambridge Univ. Press, 2003. 323 p.
- Neijts R., Amin S., van Rooijen C. et al.* Polarized regulatory landscape and Wnt responsiveness underlie Hox activation in embryos // *Genes Devel.* 2016. V. 30. P. 1937–1942.
- Niehrs C.* On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes // *Development.* 2010. V. 37. P. 845–857.
- Omori A., Kikuchi M., Kondo M.* Larval and adult body axes in echinoderms // *Reproductive and Developmental Strategies: The Continuity of Life / Eds. Kobayashi K., Kitano T., Iwao Y., Kondo M.* Springer Japan KK, part of Springer Nature: Tokyo, 2018. P. 760–789.
- Owlarn S., Bartscherer K.* Go ahead, grow a head! A planarian’s guide to anterior regeneration // *Regeneration.* 2016. V. 3. P. 139–155.
- Peterson K.J., Davidson E.H.* Regulatory evolution and the origin of the bilaterians // *PNAS USA.* 2000. V. 97. P. 4430–4433.
- Putnam N.H., Srivastava M., Hellsten U. et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization // *Science.* 2007. V. 317. P. 86–94.
- Rentzsch F., Holdstein T.W.* Making head or tail of cnidarian hox gene function // *Nature commun.* 2018. V. 9(1). P. 1–3.
- Rieger R.M., Ladurner P.* The significance of muscle cells for the origin of mesoderm in Bilateria // *Intern. Comp. Biol.* 2003. V. 43. № 1. P. 47–54.
- Röttinger E., Dahlin P., Martindale M.Q.* A framework for the establishment of a cnidarian gene regulatory network for “endomesoderm” specification: the inputs of  $\beta$ -catenin/TCF signaling // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. P. e1003164.

- Ros-Rocher N., Pérez-Posada A., Leger M.M., Ruiz-Trillo I. The origin of animals: an ancestral reconstruction of the unicellular-to multicellular transition // *Open Biol.* 2021. V. 11(2). P. 200359. <https://doi.org/10.1098/rsob.200359>
- Ryan J.F., Mazza M.E., Pang K. et al. Pre-bilaterian origins of the Hox cluster and the Hox code: evidence from the sea anemone *Nematostella vectensis* // *PLoS One.* 2007. V. 1. P. 1–23.
- Salinas-Saavedra M., Rock A.Q., Mark Q. Martindale M.Q. Germ layer-specific regulation of cell polarity and adhesion gives insight into the evolution of mesoderm // *eLife.* 2018. V. 7. P. e36740. <https://doi.org/10.7554/eLife.36740>
- Schmidt-Rhaesa A. The Evolution of Organ Systems. Oxford. N.Y.: Oxford Univ. Press., 2007. 400 p.
- Sébe-Pedrós A., Ruiz-Trillo J., Mendoza A. et al. Unexpected repertoire of metazoan transcription factors in the unicellular holozoan *Capsaspora owczarzaki* // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 1241–1254.
- Seipel K., Schmid V. Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty // *Dev. Biol.* 2005. V. 282. P. 14–26.
- Seipel K., Schmid V. Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 589–599.
- Spemann H., Mangold H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species // *Roux's Arch. Entwicklungsmech. Org.* 1924. V. 100. S. 599–638.
- Srivastava M.A. Comparative genomics perspective on the origin of multicellularity and early animal evolution // *Evolutionary Transitions to Multicellular Life. Principles and Mechanisms* / Eds. Ruiz-Trillo I., Nedelcu A.M. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2015. P. 269–300.
- Steinmetz P.R.H., Aman A., Kraus J.E.M., Technau U. Gut-like ectodermal tissue in a sea anemone challenges germ layer homology // *Nature. Ecology and Evolution.* 2017. V. 1. P. 1535–1542.
- Stern C.D., Charité J., Deschamps J. et al. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 3–15.
- Suga H., Chen Z., de Mendoza A. et al. The *Capsaspora* genome reveals a complex unicellular prehistory of animals // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2325–2330.
- Takada S., Stark K.L., Shea M.J. et al. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo // *Gen. Dev.* 1994. V. 8. P. 174–189.
- Technau U. The sea anemone *Nematostella vectensis* as a model system for the study of the evolutionary origin of triploblasty and bilaterality // *Paleodiversity.* 2010. V. 3. P. 155–157.
- Technau U., Scholz C.B. Origin and evolution of entoderm and mesoderm // *Int. J. Dev. Biol.* 2003. V. 47. P. 531–539.
- Technau U., Gunikhovich G., Kraus J.E.M. Cnidaria // *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates* / Ed. Wanninger A. Wien: Springer, 2015. V. 1. P. 115–163.
- Tschopp P., Duboule D. A genetic approach to the transcriptional regulation of Hox gene clusters // *Ann. Rev. Genet.* 2011. V. 45. P. 145–166.
- Wijesena N., Simmons D.K., Martindale M.Q. Antagonistic BMP-cWNT signaling in the cnidarian *Nematostella vectensis* reveals insight into evolution mesoderm // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. P. 5608–E5615.
- Yasuoka Y., Tando Y., Kubokawa K., Taira M. Evolution of cis-regulatory modules for the head organizer gene gooseoid in chordates: comparisons between *Bran-chiostoma* and *Xenopus* // *Zool. Lett.* 2019. V. 5. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s40851-019-0143-1>
- Zhong Y., Herrera-Úbeda C., Garcia-Fernández J. et al. Mutation of amphioxus Pdx and Cdx demonstrates conserved roles for ParaHox genes in gut, anus and tail patterning // *BMC Biology.* 2020. V. 18. P. 68. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00796-2>

## Early Stages of Animal Mesoderm Evolution

N. D. Ozernyuk<sup>1, \*</sup> and V. V. Isaeva<sup>2, 3</sup>

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

<sup>2</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Leninsky Prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>3</sup>Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690059 Russia

\*e-mail: ozernyuk@mail.ru

Genome sequencing of unicellular eukaryotes Holozoa (*Monosiga brevicollis*, *Capsaspora owczarzaki*), Porifera, Cnidaria, and Bilateria showed that the gene repertoire and gene regulatory networks that play a key role in the mesoderm emergence have an earlier evolutionary origin than expected. The appearance of Cnidaria and Bilateria occurred on the eve of the Cambrian explosion, when a huge number of new organisms species appeared. It is assumed that the genetic basis of Cambrian explosion was prepared by Hox-genes, which provided a fundamental complication of Bilateria development genetic programs.

**Keywords:** mesoderm, Cnidaria, Bilateria, gene repertoire, gene regulatory networks, signaling, Hox-genes, Cambrian explosion

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
“Актуальные проблемы биологии развития”  
12–14 октября 2021 г., Москва,  
Институт биологии развития РАН

## ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА В БЛАСТОМЕРАХ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЯМ ПАТТЕРНА СПИРАЛЬНОГО ДРОБЛЕНИЯ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

© 2022 г. А. И. Богомолов<sup>a, b</sup>, Е. Е. Воронежская<sup>b, \*</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
кафедра эмбриологии, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.

После доработки 27.11.2021 г.

Принята к публикации 03.12.2021 г.

Серотонин (5-НТ) известен как вещество с широким спектром физиологического действия. При этом его присутствие в клетках развивающегося эмбриона показано уже с самых ранних стадий развития. Однако влияние повышения уровня внутриклеточного серотонина на процессы дробления у представителей Spiralia подробно не изучалось. Мы впервые исследовали изменения в паттерне спирального дробления у пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* после инкубации яиц в растворе предшественника серотонина – 5-НТР (со стадии зиготы/2 бластомеров в течение 24 ч). В ходе дробления у всех экспериментальных эмбрионов нарушалось взаимное расположение бластомеров, начиная со стадии апикальной розетки вплоть до ранней гастрюлы. Задержка цитотомии бластомеров во всех квадрантах, включая В и D, в результате чего бластомеры приобретали несвойственные им в норме контакты. Впоследствии у 80% эмбрионов экспериментальной группы происходило необратимое нарушение гастрюляции и формирование экзогастрюлы. У эмбрионов, успешно прошедших гастрюляцию, наблюдались мальформации глаз и раковины в 10–15% случаев. Наши результаты показывают, что повышение уровня внутриклеточного серотонина приводит к нарушению взаимного расположения бластомеров у представителя Spiralia, а также может приводить к нарушениям дальнейшего развития.

**Ключевые слова:** внутриклеточный серотонин, паттерн дробления, аномалии развития, циклопия, мальформации раковины, моллюски, Gastropoda, Spiralia

DOI: 10.31857/S0475145022020033

### ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) – широко распространенный моноамин, который обычно ассоциируется с передачей сигнала между нервными клетками. Кроме этого, 5-НТ является гормоном, модулирующим нейрогенез у позвоночных, начиная с дифференцировки нервных клеток до формирования цитоархитектоники зрелого мозга (Vitalis et al., 2003; Whitaker-Azmitia, 2010; Farrelly et al., 2019). Однако, серотонин выявляется в эмбрионе уже на самых ранних, донервных стадиях, а эффекты модуляции его активности сказываются на различных процессах в развитии (Buznikov et al., 2001; Бuzников, 2007). В яйцеклетку, зиготу и бластомеры серотонин попадает из материнского орга-

низма, благодаря активности мембранных транспортеров (Murphy et al., 2004; Cote et al., 2007). 5-НТ внутри бластомеров обнаруживается как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных, и выявляется как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональных клеток (Ivashkin et al., 2019). В клетках взрослого организма серотонин может служить субстратом для трансклутаминаз – ферментов, с помощью которых происходит специфическая модификация белков – серотонилирование (Walther et al., 2011).

Серотонилирование белков существенно для регуляции долговременных, отложенных или циклических процессов (Bader, 2019). В развитии большого прудовика серотонилирование белков у эм-

брионов на стадиях раннего дробления приводило к изменению локомоторной активности развивающихся зародышей и ювенильных особей и, при определенных условиях, к возникновению необратимых нарушений гастрюляции (Ivashkin et al., 2015). События в развитии большого прудовика, предшествующие нарушению гастрюляции в случае повышения уровня серотонина в бластомерах, остались невыясненными. В частности, не были прослежены изменения, происходящие в паттерне спирального дробления.

В нашей работе мы использовали раннее развитие большого прудовика *Lymnaea stagnalis* в качестве модели для анализа влияния внутриклеточного серотонина на паттерн спирального дробления. Большой прудовик является классическим модельным объектом эмбриологии и биологии развития и его нормальное развитие достаточно хорошо изучено. В своих экспериментах мы повышали уровень внутриклеточного серотонина на ранних стадиях дробления за счет инкубации яиц в непосредственном предшественнике серотонина — 5-НТР. Расположение бластомеров на анимальном полюсе было детально картировано, отслежено их взаимное расположение у эмбрионов контрольной и экспериментальной групп. Процесс развития эмбрионов прослеживали до момента завершения метаморфоза, обращали внимание на прохождение гастрюляции, формирование раковины и глаз.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Получение и культивирование эмбрионов*

В работе использовали эмбрионы большого прудовика — *Lymnaea stagnalis* из лабораторной культуры. Содержание животных и получение кладок проводилось согласно описанной методике (Ivashkin et al., 2015). Для синхронизации эмбриональных стадий проводился индуцированный нерест путем переноса половозрелых особей из отсеков с избытком корма (салат) в чистую отстоянную воду. Через 5 ч нахождения в чистой воде, моллюски обычно откладывали кладки практически одновременно, разница в развитии между разными кладками составляла не более 30 мин. Стадии развития эмбрионов определяли по таблице развития для большого прудовика по Мещерякову (Meshcheryakov, 1990).

### *Экспериментальное повышение уровня серотонина*

Яйца извлекали из слизистого кокона и инкубировали 24 ч в 2 мл соответствующих свежеприготовленных растворов. Все растворы готовили на основе кипяченой и профильтрованной через бумажный фильтр водопроводной воды. Контрольную группу инкубировали в 0.1 мМ растворе аскорбиновой кислоты, а экспериментальную группу в

растворе, содержащем 0.1 мМ аскорбиновой кислоты и 1 мМ предшественника серотонина (5-НТР). Аскорбиновая кислота необходима для предотвращения окисления 5-НТР (Voronezhskaya et al., 2004). После 24 ч инкубации при 25°C яйца тщательно отмывали кипяченой фильтрованной водопроводной водой. Для последующего анализа использовали зародышей трех ранних стадий развития: на стадии формирования апикальной розетки, плоской бластулы и ранней гастрюлы (стадия 13, 15<sup>++</sup> и 16 по Мещерякову, соответственно). Также выделяли стадию поздней гастрюлы (стадия 18) и стадию завершения метаморфоза (стадия 27).

### *Иммунохимическое и гистохимическое маркирование*

Для иммунохимического и гистохимического маркирования часть контрольных и экспериментальных эмбрионов, достигших соответствующих стадий развития (стадии 13–18) извлекали из яйцевых капсул путем сдавливания между двумя предметными стеклами и последующим промыванием фосфатным буфером (PBS 0.01 М, pH 7.4) через сетку с ячейей 100 мкм. Эмбрионы фиксировали в 4% параформальдегиде на 0.01 М PBS в течение ночи при 4°C, а затем несколько раз промывали 5% раствором Triton X-100 на 0.01 М PBS. Оставшихся эмбрионов дорастивали до ювенильных стадий. Морфологию зародышей, прошедших метаморфоз, изучали под бинокляром (Olympus, SZ 60), аномалии развития документировали с помощью окулярной камеры (DCM 500, China).

Повышение внутриклеточного уровня 5-НТ контролировали маркированием эмбрионов антителами к серотонину (rabbit polyclonal antibody against 5-HT, Immunostar, Hudson, WI, #20080, разведение 1 : 1000), с дальнейшим выявлением вторичными антителами (goat anti-rabbit Alexa 488 conjugated IgG, Molecular Probes, 1 : 800). Все антитела разводили на блокирующем растворе, содержащем 0.01 М PBS, 5% BSA, 0.5% Triton X-100. Границы клеток маркировали фаллоидином (phalloidin-Alexa 488 conjugated, Sigma). Ядра клеток докрашивали DAPI. Тотальные препараты эмбрионов разных стадий развития просветляли в 80% глицерине, а затем монтировали на предметные стекла в 80% глицерине.

### *Анализ препаратов*

Анализ препаратов проводили с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP5). Полученные серии оптических срезов использовали для построения 3D изображений с помощью программного обеспечения микроскопа. 2D изображения максимальных проекций строили с помощью программы для анализа изображений ImageJ

(v 1.53) и графического редактора GIMP (v 2.10.18), компоновку рисунков проводили в программе Adobe Photoshop CS 8. Положения бластомеров описывали в соответствии с таблицами нормально-го развития *L. stagnalis* (Meshcheryakov, 1990).

На каждой стадии раннего развития было проанализировано не менее 25 контрольных и 30 экспериментальных эмбрионов. На стадии гастролы было проанализировано 27 контрольных и 32 экспериментальных эмбриона. До ювенильной стадии было прослежено 220 экспериментальных эмбрионов из 18 кладок. На рисунках представлены наиболее характерные эмбрионы каждой стадии развития для контрольной и экспериментальной групп.

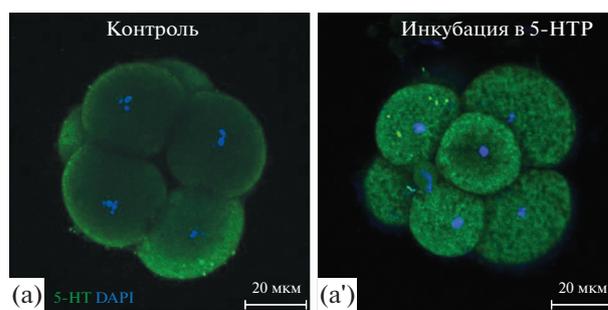
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Распределение внутриклеточного серотонина*

Инкубация в 5-НТР приводила к равномерному повышению уровня серотонина во всех бластомерах у ранних эмбрионов большого прудовика. Яркость маркирования антителами к серотонину была одинаковой в макро- и микромерах, не наблюдалось концентрации положительной реакции в каких-либо зонах бластомеров (рис. 1). Эти данные отличаются от полученных ранее результатов по инкубации эмбрионов морского брюхоногого моллюска тритонии (*Tritonia diomedea*) в 5-НТР. У эмбрионов тритонии 5-НТ в сходных условиях инкубации обнаруживался на анимальном полюсе на стадии 1–8 бластомеров и в микромерах анимального полюса на стадии морулы (Vuznikov et al., 2003).

### *Анализ паттерна дробления на последовательных стадиях развития*

При анализе паттерна расположения бластомеров на анимальном полюсе обнаружены повторяющиеся отклонения в паттерне расположения бластомеров у эмбрионов экспериментальной группы по сравнению с контрольной. Различия начинали проявляться на стадии формирования апикальных клеток розетки (стадия 13). При сравнении паттерна расположения бластомеров обнаружено, что у экспериментальных эмбрионов бластомеры  $1c^{121}$ ,  $1a^{121}$ ,  $1d^{11}$  и  $1a^{11}$  не претерпевают цитотомии, что приводит к смещению бластомера  $c^{111}$ . В результате  $c^{111}$  начинает контактировать с  $1b^{112}$ , чего не наблюдается в контроле (рис. 2а, 2а'). Разница в расположении бластомеров усиливается при достижении стадии плоской бластулы (стадия  $15^{++}$ ). У экспериментальных эмбрионов все еще не происходит цитотомии бластомера  $1a^{11}$ . В результате чего бластомеры  $1a^{12112}$  и  $1a^{12111}$ , смещаются к клетке прототроха  $1a^{21}$ , а бластомер  $1c^{12112}$  начинает контактировать с  $1b^{1211}$  (рис. 2б'). Подобные контакты между описан-

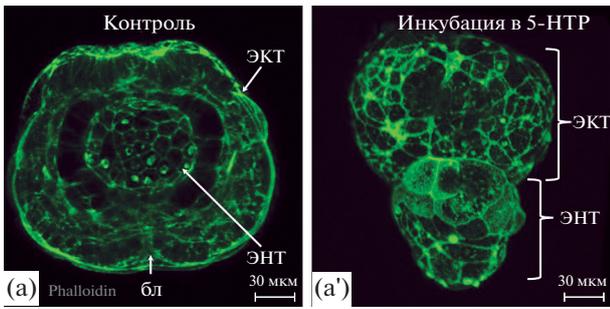


**Рис. 1.** Выявление внутриклеточного серотонина в эмбрионах большого прудовика на стадии 8 бластомеров. (а) Положительная реакция иммунохимического маркирования антителами к серотонину во всех бластомерах у контрольного эмбриона. (а') Равномерное повышение яркости иммунохимического маркирования после инкубации яйца в предшественнике серотонина (5-НТР, 1 мМ). Зеленый – антитела к 5-НТ, синий – DAPI. Масштабная линейка 20 мкм.

ными бластомерами никогда не наблюдаются в контрольной группе (рис. 2б). Максимально заметными изменения становятся на стадии ранней гастролы (стадия 16). На данной стадии у эмбрионов экспериментальной группы наблюдается ряд смещений клеток, приводящий к изменению контактов внутри квадрантов. Так, бластомер  $1c^{12112}$  сдвигается в область потомков квадранта В и начинает контактировать с  $1a^{1121}$ . При этом бластомер  $1b^{1121}$  не может контактировать с бластомером  $1a^{1121}$  (в норме  $1b^{1121}$  всегда контактирует с  $1a^{1121}$ ); а бластомер  $1a^{1122}$  контактирует с клеткой прототроха –  $1a^{21}$ , чего не встречается в контроле (рис. 2в, 2в'). После стадии ранней гастролы (стадия 16) смещения бластомеров могут варьировать из-за увеличивающегося числа клеток. При этом во всех случаях произошедшие ранее задержки в цитотомии в квадрантах С и А (бластомеры  $1c^{121}$  и  $1a^{121}$  соответственно), из-за чего смещаются отдельные бластомеры, финально приводят к существенному нарушению взаимного расположения бластомеров уже во всех квадрантах на анимальном полюсе у зародышевой экспериментальной группы.

Спиральный паттерн дробления консервативен, детерминирован и устойчив. Четко определены как положения каждого нового бластомера, так и его контакты с соседними клетками. Такое взаимодействие в случае спирального дробления принципиально, поскольку изменения в контактах или взаимном расположении бластомеров на стадиях дробления приводят к различным изменениям или нарушениям в дальнейшем развитии у гастропода, в том числе у большого прудовика (Arnolds et al., 1983). Ярким примером влияния расположения бластомеров на дальнейшее развитие является изменение генетически детерминированной закрученности раковины у большо-





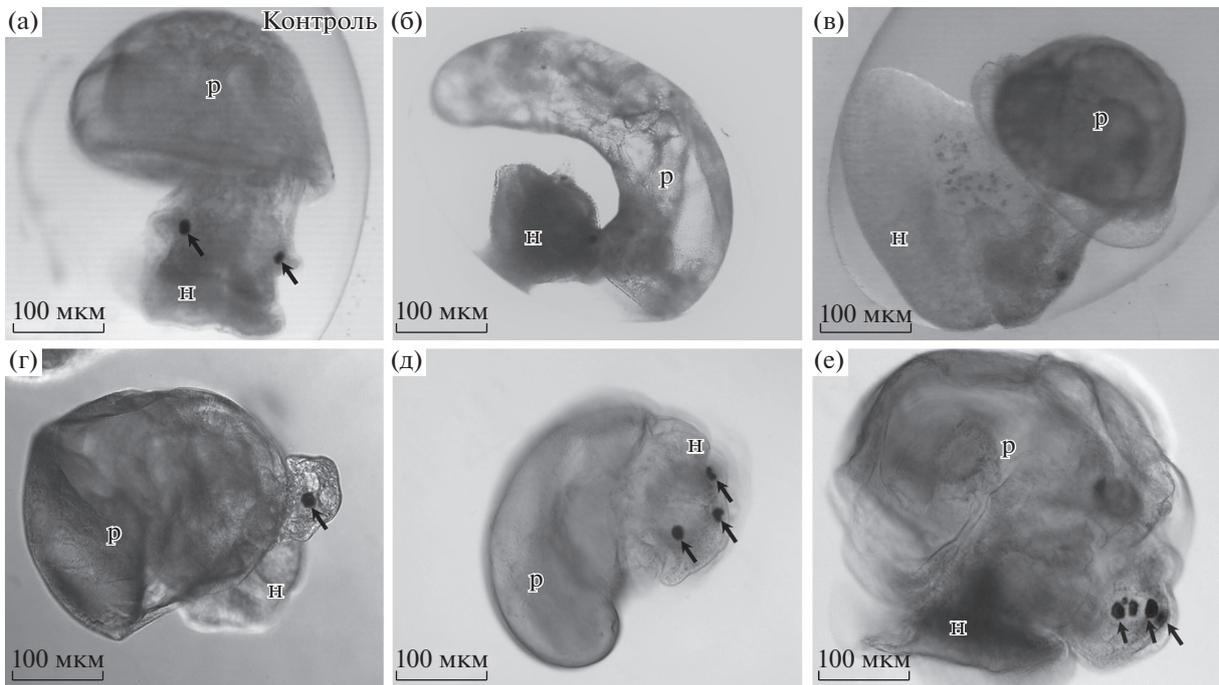
**Рис. 3.** Эмбрионы контрольной и экспериментальной групп на стадии поздней гастролы. Границы клеток промаркированы фаллоидином (зеленый). (а) По истечении 36 ч после появления первой борозды деления дробления эмбрионы контрольной группы проходят стадию поздней гастролы с хорошо выраженным бластопором. (а') Зародыши экспериментальной группы на той же стадии развития представляют собой две плотные шарообразные клеточные массы, скрепленные между собой в области формирования бластопора. Обозначения: бл – бластопор, энт – энтодерма, экт – эктодерма. Масштабная линейка 20 мкм.

*Нарушения гаструляции и мальформации*

При достижении стадии гастролы, у 80% зародышей экспериментальных групп возникает необратимая летальная аномалия развития. На этой стадии у контрольных зародышей формируется двуслойная гастрала с хорошо выраженным бластопором (рис. 3а). В это же время экспериментальные зародыши представляют собой две плотные шарообразные клеточные массы: эктодерму и энтодерму, скрепленные между собой в области формирования бластопора (рис. 3а'). Такую аномалию развития у большого прудовика ранее описывали как экзогастралу (Raven, 1966). Формирование подобных нарушений развития было описано при кратковременной инкубации эмбрионов на стадии зиготы или 2 бластомеров в растворах LiCl (Holland et al., 2005) или азакенпауллона (Kunick et al., 2003). В обоих случаях авторы предполагают вовлеченность канонического Wnt-сигнального пути в возникновение данной необратимой аномалии развития. Вопрос о влиянии серотонина на Wnt-каскад на данный момент остается открытым. Предложенная нами модель может оказаться удобной для исследований возможного взаимодействия между этими двумя регуляторными путями в процессе развития.

ствии серотонина может быть одним из вероятных механизмов, лежащих в основе нарушения перемещений бластомеров во время дробления у большого прудовика. Однако это предположение требует дополнительных экспериментальных исследований.

После стадии гастролы эмбрионы проходят в развитии стадии велигера и великонхи, претерпе-



**Рис. 4.** Примеры мальформаций, наблюдающихся у эмбрионов экспериментальной группы после завершения метаморфоза. (а) Зародыш контрольной группы с парными темными глазами и завитками раковины. (б, в) Мальформации раковины: вытянутая раковина без завитков (б), широкая раковина без завитков (в). (г–е) Мальформации глаз: циклопия (г), формирование непарных глаз (д), формирование глаз на одной стороне (е). Масштабная линейка 50 мкм. Обозначения: черная стрелка – глаза, р – раковина, н – нога.

вают метаморфоз и еще некоторое время проводят в яйце до стадии вылупления. После прохождения метаморфоза эмбрион напоминает миниатюрную взрослую улитку: у контрольных зародышей формируются голова с щупальцами и парными темными глазами, четко выделяется нога, сформированные органы висцерального комплекса закрыты завитками раковины (рис. 4а). У 10–15% зародышей экспериментальной группы, продолживших свое развитие и успешно прошедших гастрюляцию, наблюдаются мальформации двух видов. В первом случае нарушения связаны с формированием глаз. Возможно, как формирование одного асимметричного глаза (циклопия) (рис. 4г), так и появление непарных глаз (рис. 4д), или множества глаз только на одной стороне головы (рис. 4е). Вторым типом нарушений были изменение формы раковины. Формирующаяся раковина может быть удлинённой (рис. 4б), так и широкоим (рис. 4в). Наблюдалось также расхождение витков раковины между собой при сохранении нормального числа завитков. Следует отметить, что мальформации глаз и раковины могут встречаться как раздельно, так и у одного и того же зародыша.

Ранее подобные мальформации были описаны после манипуляций с микромерами, потомками 3D-организатора, а также при изменениях в положении бластомеров на цефалической пластинке у *Lymnaea stagnalis* (Arnolds et al., 1983; Martindale et al., 1985). Авторы связывают подобные мальформации с нарушениями в дифференцировке мезодермальных и эктодермальных производных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что инкубация в предшествующей стадии серотонина со стадии зиготы до 24 ч развития приводит к равномерному повышению уровня внутриклеточного серотонина во всех бластомерах у эмбрионов *Lymnaea stagnalis*. При этом наблюдается отклонение от классического паттерна спирального дробления, связанное с задержкой цитотомии у части бластомеров и смещением взаимного расположения бластомеров анимального полюса относительно друг друга. В последующем развитии у части эмбрионов возникают необратимые нарушения гастрюляции, мальформации глаз и раковины.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Евгению Ивашкину за плодотворную дискуссию в процессе обсуждения результатов. Авторы также выражают огромную благодарность рецензенту работы — Юлии Александровне Краус — за неоценимую помощь в прояснении подачи материала при подготовке рукописи к печати. Работа проводи-

лась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН, в рамках выполнения ГЗ ИБР РАН № 0088-2024-0001.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 17-14-01353.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.И. Богомоллов выполнил всю экспериментальную работу, подбирал пробы и участвовал в написании текста статьи. Е.Е. Воронежская разработала протокол эксперимента, участвовала в получении материала, в написании и редакции текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 4. С. 262–270.
- Arnolds W.J.A., Biggelaar J.A.M. van den, Verdonk N.H. Spatial aspects of cell interactions involved in the determination of dorsoventral polarity in equally cleaving gastropods and regulative abilities of their embryos, as studied by micromere deletions in *Lymnaea* and *Patella* // Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology. 1983. № 2(192). P. 75–85.
- Bader M. Serotonylation: Serotonin signaling and epigenetics // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019. № 12.
- Buznikov G.A., Lambert W.H., Lauder J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell and Tissue Research. 2001. № 2(305). P. 177–186.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Dennis Willows A.O., Nezhlin L.P. Localization. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell and Tissue Research. 2003. № 2(311). P. 259–266.
- Côté F., Fligny C., Bayard E. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. № 1(104). P. 329–334.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., Lepack A.E., Lyu Y., Bhanu N.V., Zhang B., Loh Y.-E.E., Ramakrishnan A., Vadodaria K.C., Heard K.J., Erikson G., Nakadai T., Bastle R.M., Lukasak B.G., Zebroski H., Alenina N., Bader M., Berton O., Roeder R.G., Molina H., Gage F.H., Shen L., Garcia B.A., Li H., Muir T.W., Maze I. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3 // Nature. 2019.
- Holland L.Z., Panflilio K.A., Chastain R., Schubert M., Holland N.D. Nuclear  $\beta$ -catenin promotes non-neural ectoderm and posterior cell fates in amphioxus embryos //

- Developmental Dynamics. 2005. № 4(233). P. 1430–1443.
- Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E., Adameyko I. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Reports. 2015. № 7(12). P. 1144–1158.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N., Obukhova A., Khabarova M.Y., Yakusheff A., Adameyko I., Gribble K., Voronezhskaya E.E. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // ACS Chemical Neuroscience. 2019. № 8(10). P. 3888–3899.
- Kunick C., Lauenroth K., Leost M., Maijer L., Lemcke T. 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2004. № 2(14). P. 413–416.
- Kuroda R., Abe M. The pond snail *Lymnaea stagnalis* // EvoDevo. 2020. № 1(11). P. 1–10.
- Martindale M.Q., Doe C.Q., Morrill J.B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris* // Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology. 1985. № 5(194). P. 281–295.
- Meshcheryakov V.N. The common pond snail *Lymnaea stagnalis* // Animal Species for Developmental studies. Springer, Boston, MA, 1990. P. 69–132.
- Murphy D.L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics // Mol. Interv. 2004. V. 4(2). P. 109–123.
- Raven C.P. Morphogenesis in *Lymnaea stagnalis* and its disturbance by lithium // J. Experimental Zoology. 1952. P. 121, 1–78.
- Vitalis T., Parnavelas J.G. The role of serotonin in early cortical development // Developmental Neuroscience. 2003. № 2–4(25). P. 245–256.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Nezlin L.P. Apical sensory neurones mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development. 2004. № 131(15). P. 3671–3680.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01237>
- Whitaker-Azmitia, Patricia M. Serotonin and Development // Elsevier B.V. 2010. P. 309–323.
- Walther D.J., Stahlberg S., Vowinckel J. Novel roles for biogenic monoamines: From monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoaminylation deregulation diseases // FEBS J. 2011. № 24(278). P. 4740–4755.

## Increased Intracellular Serotonin Level within Blastomeres Leads to Disruption in the Spiral Cleavage Pattern in the Mollusc *Lymnaea stagnalis*

A. I. Bogomolov<sup>1, 2</sup> and E. E. Voronezhskaya<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119934 Russia

<sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Serotonin (5-HT) is known as a substance with a wide range of physiological effects. In particular, 5-HT is present in embryonic cells from the very early stages of development. However, the consequences of increased intracellular serotonin on the cleavage pattern in Spiralia have not been studied in detail. We examined the changes in the cleavage pattern in representative Spiralia – the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* – after incubation of eggs in the serotonin precursor 5-HTP (from the zygote/2 blastomere stage for 24 hours). The arrangement of blastomeres was disrupted in all experimental embryos during cleavage, starting from the apical rosette stage and extending to the early gastrula. Delayed cytotomy of blastomeres in quadrants A and C resulted in the displacement of blastomeres in all quadrants, including B and D. As a result, the blastomeres acquired neighborhood contacts that they never have under normal conditions. Later, irreversible gastrulation abnormality with exogastrula formation occurred in 80% of experimental embryos. Finally, eye and shell malformations occurred in 10–15% of embryos that successfully passed gastrulation. Our results demonstrated that elevated intracellular serotonin level leads to disruption of blastomere cleavage pattern and can also induce developmental abnormalities and malformations during further development in a representative of Spiralia.

**Keywords:** intracellular serotonin, cleavage pattern, developmental abnormalities, cyclopia, shell malformations, molluscs, Gastropoda, Spiralia

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
 “Актуальные проблемы биологии развития”  
 12–14 октября 2021 г., Москва,  
 Институт биологии развития РАН

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДЕФОРМАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ ДВИЖЕНИЙ КЛЕТОК

© 2022 г. Д. В. Бредов<sup>a, b, \*</sup>, Н. Н. Лучинская<sup>a</sup>, И. В. Володяев<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра эмбриологии,  
 биологический факультет, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.09.2021 г.

После доработки 09.09.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

В основе эмбрионального развития организмов лежат скоординированные коллективные движения клеток. Данные о механочувствительности коллективных движений клеток позволяют предположить, что в нормальном развитии их может регулировать пространственное распределение механических сил, специфичное для каждой стадии развития. Экспериментальные подтверждения этой гипотезы немногочисленны и требуют дальнейших исследований. Одним из ключевых доказательств может стать регистрация траекторий движения клеток в эксплантате ткани, подвергнутом механической деформации, сопоставимой с таковой в нормальном развитии. Для этого необходимо осуществить контролируемую деформацию и последующую цейтраферную съемку образцов с разрешением, достаточным для распознавания отдельных клеток. В нашей работе представлены результаты применения методики деформации эксплантатов эмбриональной ткани на эластичном субстрате с помощью разработанной в нашей лаборатории установки для контролируемой одноосевой деформации. Этот подход позволил зарегистрировать движения индивидуальных клеток в растянутых эксплантатах крыши бластоцеля средней гастрюлы *X. laevis* и установить пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата.

**Ключевые слова:** механические силы, механозависимые движения клеток, развитие, гастрюляция, эмбрион, деформация ткани, *Xenopus laevis*

DOI: 10.31857/S0475145022020045

### ВВЕДЕНИЕ

Направленные коллективные движения клеток выполняют ключевую роль в процессах эмбрионального формообразования (Solnica-Krezel, 2005). Физический контакт между мигрирующими клетками важен для поддержания направления миграции (Dumortier et al., 2012). Показано, что при миграции клеточного монослоя физический контакт обеспечивает передачу механической силы от лидирующих клеток вглубь пласта, что приводит к изменению активности сигнальных комплексов, регулирующих поляризованное формирование ламеллоподий (Weber et al., 2012; Das et al., 2015). Эти данные о механочувствительности клеточной миграции позволяют предпо-

ложить, что существующее в эмбриональных тканях стадийспецифическое пространственное распределение механической силы (Belousov et al., 1975) может являться одним из факторов, регулирующих подвижность клеток при коллективных движениях в нормальном развитии. Экспериментальные подтверждения этой гипотезы, на данный момент, немногочисленны и требуют дальнейших исследований (Belousov et al., 2018).

Первые экспериментальные свидетельства участия дальнедействующих механических сил в регуляции коллективных движений клеток были продемонстрированы в работе Белоусова и соавторов (Belousov et al., 2000). В этой работе было выполнено многоэтапное растяжение эксплантатов кры-

ши бластоцеля ранней гастролы *X. laevis*, которое вызывало пассивное удлинение клеток вдоль оси деформации образца. В течение часа после окончательного растяжения клетки демонстрировали активную реакцию, постепенно возвращаясь к изодиаметрической форме. Филоподии, характерные для клеток нерастянутых образцов, замещались на ламеллоподии, часть из которых была ориентирована перпендикулярно оси растяжения. Через несколько часов после изменения морфологии клеток изменялась и форма эксплантата как целого. Изначально округлый эксплантат постепенно удлинялся вдоль оси растяжения, у него формировались медиальная борозда или характерные гантелевидные утолщения на концах (Belousov et al., 2000). Аналогичное изменение морфологии клеток предшествует началу медиолатеральной интеркаляции в хордомезодерме *X. laevis*, которая приводит к удлинению последней (Pfister et al., 2016).

Перечисленные факты позволяют предположить, что механическая сила способна инициировать интеркаляцию клеток в эмбриональных тканях. Однако, чтобы однозначно говорить об интеркаляции, необходимо продемонстрировать, что за изменением морфологии следует переупаковка клеток. Для этого нужно проследить траектории движения отдельных клеток в растянутом эксплантате эмбриональной ткани.

Чтобы подойти к выполнению этой цели, необходимо осуществить контролируемую деформацию образцов эмбриональной ткани и последующую центрифугальную съемку растянутых образцов с высоким разрешением. Для этого требуется разработать установку для контролируемой одноосевой деформации, которая позволила бы применить методику растяжения эксплантатов эмбриональной ткани на прозрачном эластичном субстрате (Carpí, Piel, 2014; Goddard et al., 2020) и установить пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Получение и культивирование эмбрионов*

Эмбрионы *X. laevis* получали оплодотворением *in vitro* согласно стандартному протоколу (Sive et al., 2000). Через 30–45 мин после оплодотворения удаляли студенистые оболочки, инкубируя эмбрионы в 2% растворе L-цистеина на  $0.1 \times$  Marc's Modified Ringer (MMR). После инкубации в цистеине эмбрионы промывали 4–5 раз  $0.1 \times$  MMR и культивировали в  $0.1 \times$  MMR до необходимой стадии. Стадию развития эмбрионов определяли по таблицам нормального развития (Nieuwkoop, Faber, 1958).

### *Инъекция РНК*

Для визуализации границ клеток осуществляли инъекцию мРНК мембранного (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркеров. мРНК синтезировали с имеющихся в лаборатории плазмид рCS2+/GAP43-GFP и рCS2+/H<sub>2</sub>B-mCherry, которые любезно предоставил доктор Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe). Выделение целевых плазмид после амплификации осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Evrogen), синтез РНК – с помощью набора mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription (Invitrogen), согласно предоставленному производителем протоколу. Оба набора были любезно предоставлены С. В. Кремневым (каф. эмбриологии МГУ им. М.В. Ломоносова).

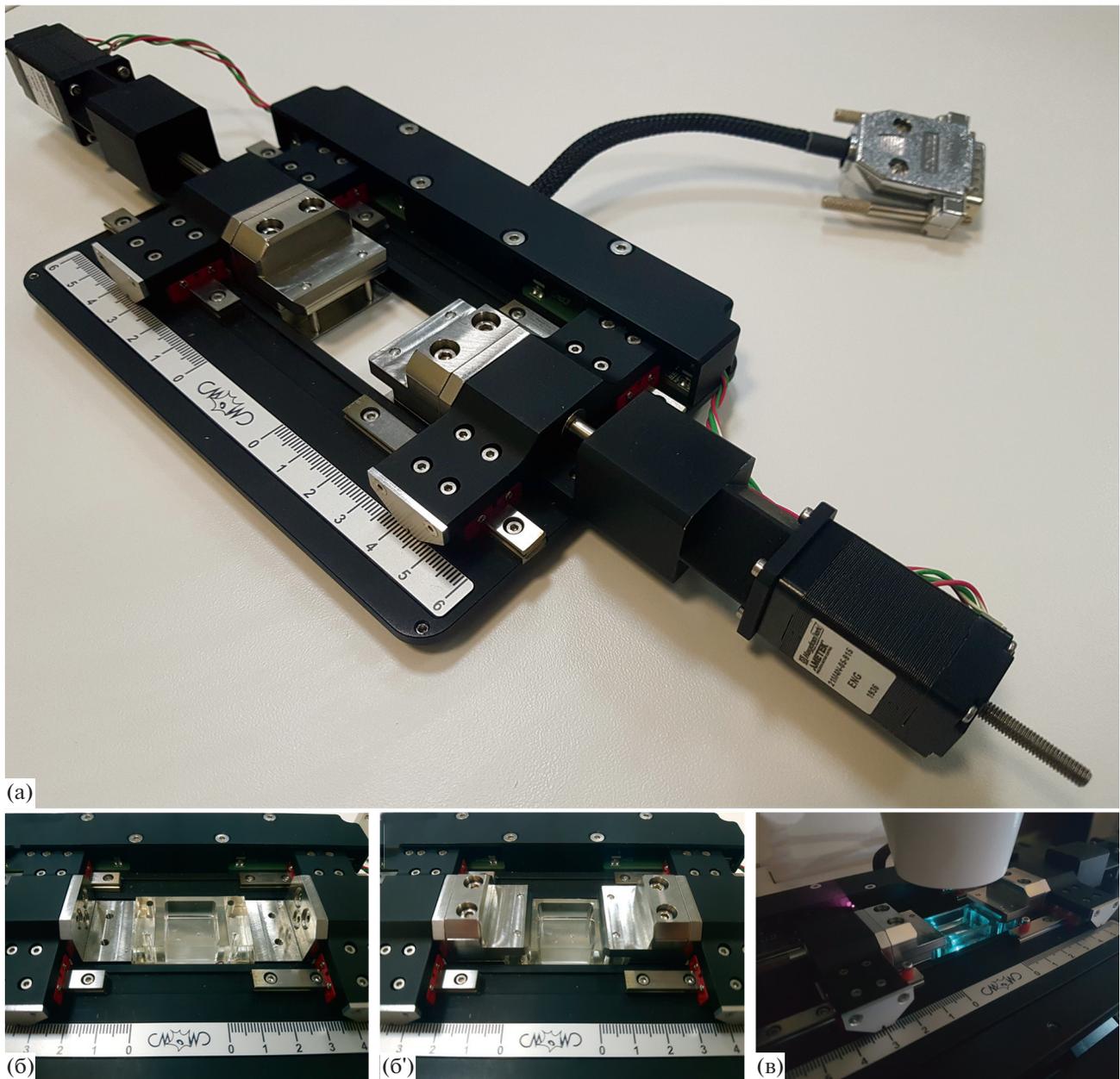
Эмбрионы на стадиях от 2-х до 4-х бластомеров переносили из  $0.1 \times$  MMR в раствор фикола на  $0.3 \times$  MMR. Затем осуществляли инъекцию мембранного (РНК GAP43-GFP) и ядерного (РНК H2B-mCherry) маркеров общим количеством 230 пг в случае GAP43-GFP и 230 пг в случае H2B-mCherry. Инъекцию производили в каждый из двух (четырех) анимальных бластомеров, суммарный объем инъекции составлял 9.2 нл. После инъекции эмбрионы оставляли в растворе фикола на  $0.3 \times$  MMR для предотвращения образования протрузий в местах инъекции и культивировали при температуре 14–15°C до достижения зародышами стадии 10–10.5 согласно таблицам нормального развития.

### *Микрохирургические операции*

В ходе микрохирургических операций проводили экстирпацию крышки бластоцеля эмбрионов на стадиях 10–10.5 для экспериментов по искусственной деформации (Nieuwkoop, Faber, 1967). Перед началом операции студенистую оболочку снимали 2.5% раствором цистеина в  $1 \times$  MMR, желточную оболочку снимали пинцетами вручную. Затем эмбрионы переносили в чашку Петри, заполненную  $1 \times$  MMR, где с помощью микрохирургического ножа и стеклянной палочки экстрипировали выбранную зону. Получившиеся эксплантаты переносили в заранее подготовленные инкубационные камеры (см. раздел “Искусственная деформация эксплантатов”) с помощью пластиковой пипетки.

### *Искусственная деформация эксплантатов*

Для искусственной деформации эксплантаты прикрепляли к эластичному субстрату с помощью адгезионного покрытия из белков внеклеточного матрикса, после чего растягивали субстрат. Адгезионное покрытие обеспечивало передачу растяжения от субстрата к эксплантату. Растяжение субстрата осуществляли с помощью изготовленной на



**Рис. 1.** (а) Общий вид установки для растяжения. (б) Монтрование эластичной инкубационной камеры в зажимы установки для растяжения. (в) Общий вид установки для растяжения, смонтированной на ЛСЖМ.

заказ установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных субстратов для культивирования клеток и эмбриональных тканей (рис. 1а; патент RU2723726С1, ООО “Троицкий инженерный центр”, Россия). Далее в тексте статьи мы будем называть ее “установкой для растяжения”.

В качестве эластичного субстрата использовали дно инкубационной камеры, изготовленной из полидиметилсилоксана (PDMS), которое представляет собой ультратонкую прозрачную мембрану толщиной 100–200 мкм. Использовали два типа камер: самодельные камеры, изготовленные в нашей

лаборатории, с диапазоном растяжения до 85% и коммерческие инкубационные камеры производства STREX (STREX Inc., США) с диапазоном растяжения до 20%.

Для изготовления камер в лаборатории, вырезали фрагмент сверхтонкой эластичной пленки Gel-Pak PF-40-X0 (Gel-Pak, США) с необходимыми геометрическими размерами, снимали защитный слой и с помощью пинцета переносили пленку в пластиковую чашку Петри с 70% этанолом, после чего инкубировали в течение 20 мин на качалке для удаления остатков липкого осно-

вания защитного покрытия. Затем пленку переносили в сухую крышку чашки Петри и сушили под ламинатором. После полного высыхания спирта на пленку устанавливали бортики из PDMS и герметизировали соединение между бортиками и пленкой с помощью силиконовой смазки High Vacuum Grease (Dow Corning, США).

Чтобы обеспечить адгезию эксплантатов ко дну камер, на него наносили адгезионное покрытие из фибронектина человека. Для нанесения адгезионного покрытия как коммерческие, так и самодельные камеры перед экспериментом подвергали предварительной обработке. Для этого дно камеры облучали под УФ-лампой ламинатора на расстоянии 3 см от лампы в течение 30–45 мин, чтобы сделать изначально гидрофобный материал камеры более гидрофильным и увеличить его сродство к фибронектину (Azioune et al., 2011; Goddard et al., 2020). Немедленно после облучения внутрь камеры вносили 1 мл фибронектина человека с концентрацией 1 мг/мл (ООО “Имтек”, Россия) и оставляли инкубироваться на ночь при 4°C (Davidson et al., 2002; Ramos, DeSimone, 1996). На следующий день удаляли остатки раствора фибронектина, заливали в инкубационную камеру 1–2 мл 1× MMR и монтировали ее в установку для растяжения (рис. 1б'–1б"). Перед внесением эксплантатов инкубационную камеру прерастягивали на 0.5 мм, чтобы минимизировать провисание дна.

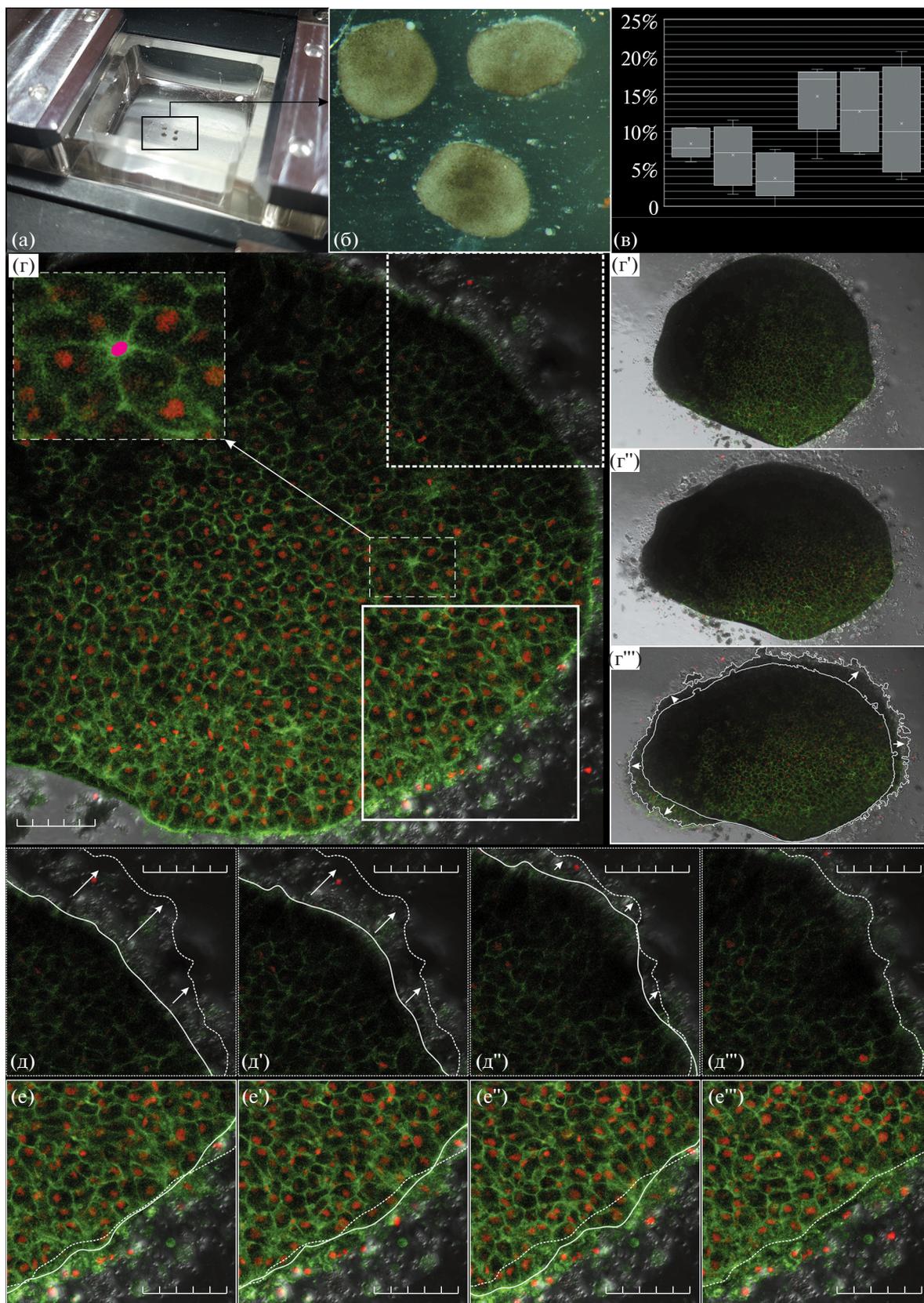
После подготовки инкубационной камеры экспирпировали крышку бластоцеля эмбрионов *X. laevis* на стадии 10–10.5 (см. раздел “Микрохирургические операции”) (Nieuwkoop, Faber, 1958). Эксплантаты крыши помещали в инкубационную камеру гипоектодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на силиконовых ножках, после чего инкубировали в течение двух

часов при комнатной температуре для стимуляции адгезии эксплантатов к матриксу. После двух часов инкубации снимали покровное стекло и, в зависимости от задачи, монтировали установку для растяжения с закрепленной в ней инкубационной камерой на предметный столик выбранного микроскопа (рис. 1б").

Для определения эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани, деформацию субстрата и последующую съемку эксплантатов осуществляли на стереомикроскопе Olympus SZX 9 (рис. 2а). Для механической деформации эксплантатов инкубационную камеру растягивали на 20% с шагом 3/8 мкм в течение 10 с (выбор времени растяжения объясняется в разделе “Результаты”). Эксплантаты фотографировали до и после растяжения, после чего измеряли удлинение эксплантата при заданной величине деформации субстрата.

Для регистрации движений клеток после механической деформации эксплантатов эмбриональной ткани, деформацию субстрата и последующую цейтраферную съемку осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM800 (рис. 2г). Чтобы оценить изменение формы эксплантатов в ходе растяжения, перед искусственной деформацией, эксплантаты фотографировали в проходящем свете на минимальных значениях цифрового увеличения. Одновременно регистрировали сигнал по флуоресцентным каналам, чтобы оценить степень прикрепления эксплантата по морфологии клеток его на периферии (рис. 2г'–2г"). Если клетки данной области демонстрировали характерную для клеток эпидермы эпителиальную морфологию, отличную от мезенхимальной морфологии клеток гипоектодермы, то это свидетельствовало о подворачивании краев эксплантата, и, следова-

**Рис. 2.** (а) Инкубационная камера с эксплантатами крыши бластоцеля во время двухчасовой инкубации. (б) Общий вид эксплантатов крыши бластоцеля после двухчасовой инкубации на эластичном субстрате. (в) Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани. По оси ординат: удлинение эксплантата вдоль оси растяжения в %. Каждый блок диаграммы размаха соответствует группе из 4–6 эксплантатов, крестик – среднее удлинение в группе, линия – эксклюзивная медиана. Средняя эффективность удлинения составила  $54.7 \pm 26.5\%$ . (г) Кадр цейтраферной съемки эксплантата крыши бластоцеля после растяжения. Фрагмент, выделенный рамкой “пунктир с точкой” – клеточная розетка (центр розетки обозначен розовой точкой), фрагмент, выделенный пунктирной рамкой – участок границы эксплантата, представленный на  $d-d''$ , фрагмент, выделенный сплошной рамкой – участок границы эксплантата, представленный на  $e-e'''$ . Длина мерного отрезка 100 мкм ( $g-g'''$ ) – фотографии эксплантата крыши бластоцеля перед растяжением ( $g'$ ), после растяжения ( $g''$ ) и по окончании часовой цейтраферной съемки ( $g'''$ ); белый контур: границы эксплантата в начале и в конце съемки, стрелки – направление смещения границы). (д, е) Региональные различия в активности направленного движения клеток. За время цейтраферной съемки граница эксплантата, ориентированная перпендикулярно направлению растяжения сместилась на расстояние от 35 до 60 мкм ( $d-d''$ ), в то время как границы, ориентированные параллельно направлению растяжения (фрагмент, выделенный сплошной рамкой) практически не сместились ( $e-e'''$ ). ( $d-d''$ ) Изменение положения границы эксплантата, ориентированной перпендикулярно направлению растяжения: (д) – положение границы сразу после 13–14% растяжения эксплантата, (д') – через 19 мин после окончания растяжения, (д'') – через 39 мин после окончания растяжения, (д''') – через 59 мин после окончания растяжения; сплошная линия – текущее положение границы эксплантата, пунктирная линия – положение границы эксплантата в конце съемки, стрелки – направление движения границы эксплантата. ( $e-e'''$ ) Изменение положения границы эксплантата, ориентированной параллельно направлению растяжения: (е) – положение границы сразу после 13–14% растяжения эксплантата, (е') – через 19 мин после окончания растяжения, (е'') – через 39 мин после окончания растяжения, (е''') – через 59 мин после окончания растяжения; обозначения те же, что и в (д). Длина мерного отрезка на (д) и (е) 100 мкм.



тельно, о низкой эффективности прикрепления. Такие эксплантаты исключались из эксперимента. Механической деформации подвергали только эксплантаты, прикрепившиеся к субстрату всей поверхностью. Для механической деформации эксплантатов инкубационную камеру растягивали на 20% с шагом 3/8 мкм в течение 10 мин (выбор времени растяжения объясняется в разделе “Результаты”). По завершении растяжения эксплантат фотографировали в проходящем свете на минимальных значениях цифрового увеличения, после чего переключались на большее значение цифрового увеличения и приступали к съемке движений клеток.

#### *Регистрация движений клеток*

Съемку производили с помощью объектива Plan-Apochromat 10×/0.45 M27 (цифровое увеличение ×1.1) в течение часа с частотой 1 кадр в 2 мин. Каждый кадр состоял из 19 оптических срезов. Регистрацию оптических срезов начинали с позиции по оси Z, на которой наблюдали появление флуоресцентного сигнала. По окончании съемки оптические срезы сводили в единое изображение с помощью алгоритма “Maximum intensity projection” программного комплекса ZEISS ZEN (black edition). В тексте статьи под формой клетки мы будем понимать форму сечения клетки, зарегистрированную на таком изображении.

#### *Морфометрия эксплантатов*

Измерение линейных размеров эксплантатов для определения эффективности растяжения осуществляли с помощью программы ICY bioimaging platform. Форму эксплантатов определяли с помощью модуля “Active contours (4.4.10.0)”, при необходимости результаты распознавания корректировали вручную. Обсчет полученных значений осуществляли в программе Microsoft Excel 365.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### *Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани*

Перед началом эксперимента мы оценили эффективность методики растяжения на 6 тестовых группах эксплантатов. Эффективность растяжения эксплантатов ткани рассчитывали как частное среднего удлинения в группе из 4–6 эксплантатов и удлинения самой инкубационной камеры (рис. 2в). Амплитуда растяжения камеры для всех групп была одинакова и составляла 20% при времени растяжения 10 с. Такое малое время растяжения позволяет достичь наибольшей скорости деформации и, т.о., обеспечивает наилучшую проверку степени адгезии эксплантата ко дну камеры.

При выбранных концентрации фибронектина и протоколе его нанесения растяжение субстрата передается на эксплантаты с эффективностью  $54.7 \pm 26.5\%$ , что, в целом, согласуется с описанными в литературе данными (от 56 до  $77.2 \pm 20.4\%$  (Nestor-Bergmann et al., 2019; Wang et al., 2001)).

#### *Анализ пространственно-временной динамики движений клеток*

В экспериментальной группе, включающей 4 эксплантата, нам удалось добиться 64% эффективности растяжения, т.е. преимущественно 13–14% удлинения эксплантатов при 20% равномерном растяжении субстрата в течении 10 минут. Такое значение скорости деформации эксплантатов было выбрано на основании данных, полученных в нашей лаборатории на интактных эмбрионах. В этих экспериментах деформация супрабластопоральной области средней гастролы *X. laevis* достигала 72% от изначальной длины в час (Evstifeeva et al., 2018).

По окончании растяжения эксплантат оставляли в растянутом состоянии и осуществляли съемку движений клеток в течение часа. За время съемки эксплантат преимущественно удлинился вдоль оси растяжения (рис. 2г<sup>'''</sup>). в то время как изолированный эксплантат увеличивает свою площадь одинаково во всех направлениях вследствие движений радиальной интеркаляции (Stepien et al., 2018). Изменение формы эксплантата происходило за счет движений клеток. В данном случае, под движениями мы понимаем как перегруппировки клеток (смещение клетки внутри пласта, приводящее к изменению ее положения относительно соседних), так и направленную коллективную миграцию (продолжительное перемещение в выделенном направлении, не обязательно связанное со сменой соседей).

Перегруппировки клеток превалировали в центральной части всех исследованных эксплантатов. Основным механизмом перегруппировки являлось формирование клеточных розеток (рис. 2г, увеличенный фрагмент, выделенный рамкой “пунктир с точкой”, центр розетки обозначен розовой точкой). При этом частота перегруппировок была достаточно низкой: за час наблюдения нам удалось зарегистрировать формирование и начало распада 2–3 розеток, в то время как в нормальном развитии количество возникающих розеток за то же время наблюдения достигает 9.

Гораздо больший вклад в изменение формы эксплантата вносила направленная миграция клеток в периферической зоне. Периферические 4–5 рядов клеток эксплантата осуществляли миграцию в радиальном направлении, т.е. вдоль оси, соединяющей центр эксплантата с периферией (рис. 2г<sup>'''</sup>, стрелки). При этом, наиболее

активно процесс миграции протекал в области границ эксплантата, ориентированных перпендикулярно направлению растяжения. Участок такой границы выделен на рис. 2г пунктирной рамкой. Миграция клеток, расположенных вдоль этих границ, привела к их смещению примерно на 35–60 мкм вдоль оси растяжения (рис. 2д–2д'''; граница эксплантата в конце съемки показана пунктирной линией). Клетки, расположенные вдоль границ эксплантата, параллельных направлению растяжения, также демонстрировали подвижность, однако мигрирующий край смещался относительно изначального положения не более чем на 10 мкм (рис. 2г, фрагмент, выделенный сплошной рамкой; рис. 2е–2е'''). Таким образом, миграция клеток и смещение границы эксплантата преимущественно происходила в направлении растяжения эксплантата.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты применения методики деформации эксплантатов эмбриональной ткани с помощью установки для контролируемой одноосевой деформации эластичных субстратов. Нами были зарегистрированы траектории движения индивидуальных клеток в растянутых эксплантатах крыши бластоцеля средней гастролы *X. laevis*. Были установлены пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата, приводящей к изменению его формы. Таким образом, мы создали необходимые методические предпосылки для возможности экспериментального доказательства роли эндогенных механических сил в регуляции направленных коллективных движений клеток.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe) за любезно предоставленные плазмиды GAP43-GFP и H2B-mCherry, содержащие целевые последовательности флуоресцентных маркеров клеточных мембран и ядер соответственно, С.В. Кремневу за неоценимую помощь при синтезе РНК флуоресцентных маркеров, М.М. Мойсеновичу за помощь в реализации проекта установки для растяжения.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90191 и № 20-01-00329 и Государственного задания ИБР им Н.К. Кольцова РАН (тема 0088-2021-0009). Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.В. Бредов разработал концепцию статьи.  
И.В. Володяев, Н.Н. Лучинская и Д.В. Бредов спланировали эксперимент.  
Н.Н. Лучинская осуществляла получение эмбрионов и микроинъекцию флуоресцентных маркеров.  
Д.В. Бредов осуществлял эксперименты по растяжению и прижизненную цейтраферную съемку эмбрионов.  
Д.В. Бредов и Н.Н. Лучинская осуществляли анализ данных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azioune A. et al.* Robust method for high-throughput surface patterning of deformable substrates // *Langmuir*. 2011. V. 27. № 12. P. 7349–7352.
- Belousov L.V. et al.* Local and global dynamics in collective movements of embryonic cells // *BioSystems*. 2018. V. 173. P. 36–51.
- Belousov L.V. et al.* Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 34. № 3. P. 559–574.
- Belousov L.V. et al.* Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // *Dev. Genes Evol.* 2000. V. 210. № 2. P. 92–104.
- Carpí N., Piel M.* Stretching micropatterned cells on a PDMS membrane // *J. Vis. Exp.* 2014. № 83. P. 1–6.
- Das T. et al.* A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 3. P. 276–287.
- Davidson L.A. et al.* Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: Combined roles for integrin  $\alpha 5\beta 1$ , fibronectin, and tissue geometry // *Dev. Biol.* 2002. V. 242. № 2. P. 109–129.
- Dumortier J.G. et al.* Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 42. P. 16945–16950.
- Evstifeeva A.Y. et al.* Stress-generating tissue deformations in *Xenopus* embryos: Long-range gradients and local cell displacements // *BioSystems*. 2018. V. 173. P. 52–64.
- Goddard G.K. et al.* Applying tensile and compressive force to *Xenopus* animal cap tissue // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020. V. 2020. № 3. P. 68–74.
- Nestor-Bergmann A. et al.* Decoupling the roles of cell shape and mechanical stress in orienting and cueing epithelial mitosis // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 8. P. 2088–2100.e4.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) // *Copeia*. 1958. V. 1958. № 1. P. 65.
- Pfister K. et al.* Molecular model for force production and transmission during vertebrate gastrulation // *Dev.* 2016. V. 143. № 4. P. 715–727.

- Ramos J.W., DeSimone D.W. Xenopus embryonic cell adhesion to fibronectin: Position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation // *J. Cell Biol.* 1996. V. 134. № 1. P. 227–240.
- Sive H.L. et al. Early development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual.: CSHL Press, 2000. P. 249–297.
- Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 6. P. 213–228.
- Stepien T.L. et al. Using a continuum model to decipher the mechanics of embryonic tissue spreading from time-lapse image sequences: An approximate Bayesian computation approach // *PLoS One.* 2018. V. 14. № 6. P. 1–23.
- Wang J.H.C. et al. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching // *J. Biomech.* 2001. V. 34. № 12. P. 1563–1572.
- Weber G.F. et al. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration // *Dev. Cell.* 2012. V. 22. № 1. P. 104–115.

## Establishment a Method for Controllable Deformatio of Embryonic Tissues to Study Mechanodependent Cell Movements

D. V. Bredov<sup>1, 2, \*</sup>, N. N. Luchinskaya<sup>1</sup>, and I. V. Volodyaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119334 Russia

<sup>2</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Embryonic development in animals is underlied by coordinated collective cell movements. Mechanosensitivity of collective cell movements suggests that in the intact embryos they may be regulated by mechanical force pattern specific to each developmental stage. Experimental validation of this hypothesis requires further investigations. The key piece of evidence would be tracing of cell trajectories in a tissue explant subjected to mechanical deformation comparable to that in normal development. This requires controlled stretching and subsequent time-lapse imaging of the explant at a resolution sufficient to identify individual cells. We performed stretching of embryonic tissue explants on an elastic substrate using the device for controlled uniaxial deformation developed in our laboratory. This allowed us to register the movements of individual cells in the stretched explants of *X. laevis* midgastrula blastocell roof, and to establish the threshold values of rate and time of stretching required for the initiation of cell movements within the explant.

**Keywords:** mechanical forces, mechanodependent cell movements, development, embryo, tissie deformation *Xenopus laevis*

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
“Актуальные проблемы биологии развития”  
12–14 октября 2021 г., Москва,  
Институт биологии развития РАН

## ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ПЕРИЦЕНТРОМЕРНОЙ ДНК НА ФОРМИРОВАНИЕ БЕЗМЕМБРАННЫХ СТРУКТУР В СОЗРЕВАЮЩИХ ООЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. М. А. Добрынин<sup>а</sup>, \*, Н. М. Корчагина<sup>б</sup>, <sup>с</sup>, Н. В. Пономарцев<sup>а</sup>,  
О. И. Подгорная<sup>а</sup>, Н. И. Енукашвили<sup>а</sup>, \*\*

<sup>а</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>б</sup>Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>с</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: [dobrmak1555@mail.ru](mailto:dobrmak1555@mail.ru)

\*\*e-mail: [n.enukashvily@incras.ru](mailto:n.enukashvily@incras.ru)

Поступила в редакцию 20.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 07.12.2021 г.

Перицентромерная тандемно повторяющаяся некодирующая ДНК (ТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. Перицентромерная ТП ДНК включает в себя классические сателлиты человека 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3), которые транскрибируются в соматических клетках. Ранее нами показано наличие транскриптов *HS2/HS3* в позднем оогенезе человека и определена их последовательность. Было высказано предположение, что найденные РНП могут быть местом пространственной секвестрации РНК и белков в созревающих ооцитах. Цель работы – разработка метода инактивации транскриптов *HS2/HS3* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов для оценки ее влияния на размер и количество DDX4-содержащих РНП в созревающих ооцитах человека. Инактивация транскрипции *HS2/HS3* в созревающих ооцитах человека методом микроинъекции привела к достоверному уменьшению суммарного сигнала РНК *HS2/HS3*, выявляемого методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Одновременно с этим наблюдалось увеличение количества включений, окрашиваемых антителами к РНК-хеликазе DDX4. Возможно, при инактивации транскрипции *HS2/HS3* происходит диссоциация DDX4-содержащих РНП частиц. Подобные изменения РНП частиц могут играть критическую роль для развития ооцитов, быть причиной остановки созревания или возникновения патологических синдромов, в том числе связанных с проблемами оплодотворения.

**Ключевые слова:** оогенез, эмбриогенез, *HS2/HS3*, DDX4, зародышевые гранулы, безмембранные биомолекулярные конденсаты

DOI: 10.31857/S0475145022020057

### ВВЕДЕНИЕ

Перицентромерная тандемно повторяющаяся некодирующая ДНК (ТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. Перицентромерная ТП ДНК включает в себя классические человеческие сателлиты 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3) (Richard et al., 2008), которые транскрибируются в соматических клетках (Enukashvily, Ponomartsev, 2013). Подобные транскрипты также обнаруживаются в

клетках эмбрионов до и после имплантации (Трофимова и др., 2018; Yandim, Karakulah, 2019). Ранее в нашей лаборатории впервые обнаружена транскрипция перицентромерной ТП ДНК *HS2/HS3* в позднем оогенезе человека – при переходе ооцитов от стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV) к стадии метафазы I мейоза (metaphase I, MI). Транскрибируемыми являлись обе цепи *HS2/HS3*. РНК *HS2/HS3* обнаружены в составе рибонуклеопротеиновых включений, содер-

жащих РНК-хеликазы DDX5 и DDX4, локализованные вблизи митохондрий (Dobrynin et al., 2020). При анализе опубликованных транскриптомов ооцитов человека стадий GV, MI, MII нами выявлено и охарактеризовано четыре полиаденилированных транскрипта *HS2/HS3* (Dobrynin et al., 2020). Обнаруженные включения предположительно являются характерными для клеток зародышевой линии рибонуклеопротеинами (РНП), называемыми зародышевые гранулы (ЗГ) (Добрынин, Енукашвили, 2020). Данное предположение основывается на следующих фактах: а) в обнаруженных включениях обнаружен белок DDX4, который является маркерным белком ЗГ млекопитающих (Reunov, Reunova, 2015); б) выявленные нами РНП локализованы с митохондриями, что также характерно для ЗГ ооцитов млекопитающих (De Smedt et al., 2000). ЗГ млекопитающих — это биоконденсаты, которые образуются с помощью механизмов фазовых переходов типа “жидкость—жидкость”. Разделение фаз придает этим РНП свойства “капли в капле”, позволяя гранулам быстро конденсироваться и растворяться в зависимости от состава окружающей среды и обеспечивать их обмен компонентами. Присутствие в таких образованиях некодирующих транскриптов ТП ДНК показано впервые и их роль в формировании выявленных включений неясна.

Цель работы — разработка метода инактивации транскриптов *HS2/HS3* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов для оценки влияния на размер и количество DDX4-содержащих РНП в созревающих ооцитах человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Этическое одобрение*

Все ооциты получали от доноров согласно стандартам, изложенным в приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации № 803н от 31.07.2021 г., и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) (Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием людей, включая поправки, внесенные 64-м совещанием ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013 г.). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом сети клиник Ava-Peter-Scandinavia (№ 11/22-12-2016). Письменное информированное согласие было получено от каждого донора, включенного в исследование.

### *Олигонуклеотиды*

На основе консенсусных последовательностей *HS2/HS3* были подобраны прямой и обратный олигонуклеотиды, инактивирующие РНК *HS2/HS3* и

содержащие 2'-О-метил-РНК модификацию по всей длине олигонуклеотидов: 5'-AAUGGAAUC-GAAUGGAAUC-3' и 5'-GAUUCGAUUCGAUUC-CAUU-3'. Модификация 2'-О-метил обеспечивает устойчивость РНК к воздействию нуклеаз и значительно повышает ее сродство к РНК-мишени (температура плавления, по сравнению с ДНК-РНК дуплексом, выше) (Lennox, Behlke, 2011).

Для FISH использовался олигонуклеотидный зонд DYZ1: 5'-TCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCC-3', меченый флуорохромом FITC по 5'-концу (Евроген, Россия) (Dobrynin et al., 2020).

### *Преовуляторные ооциты человека*

Ооциты, находящиеся на одной из двух стадий: GV или MI ( $n = 11$ ) были получены от здоровых доноров, включенных в программу донорства ооцитов, по стандартным протоколам стимулирования овуляции. Ооциты собирали иглой во время трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов под контролем сонографии. В ходе процедуры такие фолликулы отбирали по двум признакам: размеру (выше 17–18 мм) и наличию хорошо выраженной антральной полости. Помимо ооцитов, вступивших в метафазу II мейоза (MII), аспиранты содержали ооциты на стадиях GV, MI. Качество обработанных гиалуронидазой ооцитов без кумюса оценивали с помощью стереомикроскопии. Ооциты были отсортированы на подходящие и неподходящие для программы донорства. Ооциты считались зрелыми и подходящими для донорства, если они достигли стадии MII в соответствии с протоколом Стандартной Операционной Процедуры (СОП) клиник Ava-Peter-Scandinavia. Ооциты GV и MI без морфологических аномалий исключили из программы донорства яйцеклеток ввиду экономической нецелесообразности их банкирования, но не из-за аномалий развития. Их использовали в исследовании, если информированное согласие было подписано донором. Степень зрелости мейотических клеток оценивали, как описано в (Dobrynin et al., 2020).

После удаления дебриса и микроскопического исследования ооциты GV и MI помещали в 1 мкл среды для манипуляции SynVibro Flush (CooperSurgical, США) на предметное стекло и фиксировали в 40 мкл фиксатора (96° этанол/ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1), охлажденно до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Препараты сушили на воздухе и хранили при комнатной температуре. Для каждого эксперимента использовали не менее трех ооцитов.

*Флуоресцентная гибридизация in situ*

Распределение транскриптов *HS2/HS3* и белка DDX4 в преовуляторных ооцитах человека на стадиях GV и MI исследовали с помощью метода FISH совместно с прямым иммуноцитохимическим окрашиванием (иммуно-ДНК-РНК-FISH) как описано в (Dobrynin et al., 2020).

В качестве негативного контроля для части ооцитов проводили предобработку РНКазой А. Для этого фиксированные препараты отмывали от фиксатора и инкубировали в растворе РНКазы А (200 мкг/мл) (Биолот, Россия) на 2× растворе цитрата натрия (SSC) (рН 7.0) в течение 1 ч при температуре 37°C. Затем препараты отмывали в 2× SSC 10 мин при комнатной температуре и использовали для иммуно-ДНК-РНК-FISH с *HS2/HS3* гибридизационным зондом. Отсутствие флуоресцентных сигналов в обработанных РНКазой А ооцитах рассматривали как подтверждение того, что наблюдаемые в необработанных ооцитах сигналы обусловлены взаимодействием зонда с РНК, а не с ДНК.

Чтобы оценить локализацию транскриптов *HS2/HS3* относительно маркера зародышевых гранул ооцитов – хеликазы DDX4 (методика описана выше), препараты ооцитов после ДНК-РНК-FISH выдерживали в 5% бычьем сывороточном альбумине в 1× фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 ч. Далее применяли мышинные моноклональные антитела (АТ) против DDX4 (1 : 200, Abcam, #ab196708), конъюгированные с Alexa 647. Затем препараты промывали в PBS, содержащем 0.02% Tween-20 (PBST), трижды, по 10 мин каждый. После этого препараты ополаскивали дистиллированной водой и помещали в среду, содержащую агент, предохраняющий от выгорания флуорохрома, и DAPI (ThermoFisher, США).

*Микроинъекции*

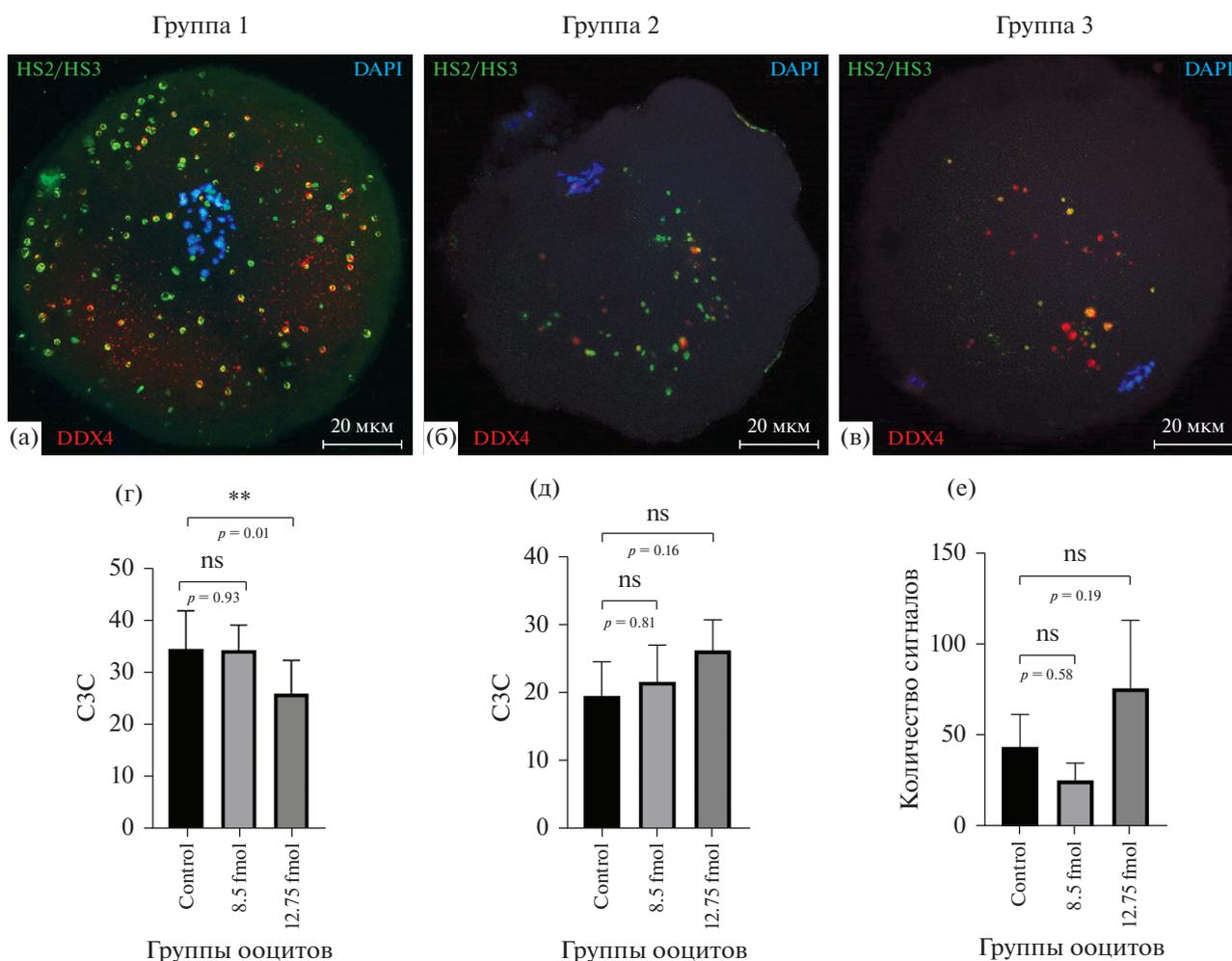
Для инактивации транскрипции *HS2/HS3* в GV/MI ооцитах человека были выполнены цитоплазматические микроинъекции с помощью микроманипулятора Interegra RI. Перед экспериментом ооциты были разделены на 3 группы ( $n = 11$ ). В группе 1 (контроль,  $n = 4$ ) в ооциты вводили физиологический раствор (127.5 фл). В группе 2 ( $n = 3$ ) в каждый ооцит вводили 85 фл (8.5 фмоль) антисмысловых олигонуклеотидов. В группе 3 ( $n = 4$ ) вводимый объем составлял 127.5 фл (12.75 фмоль) антисмысловых олигонуклеотидов. После инъекции ооциты помещали в питательную среду для инкубирования One step Media (Irvine Scientific) в CO<sub>2</sub>-инкубатор, а через 48 ч фиксировали и исследовали по протоколам, описанным выше.

*Микроскопирование*

Для получения оптических срезов и трехмерного анализа препаратов использовали конфокальный микроскоп Olympus FV3000 (Olympus, Япония). Для детекции DAPI, FITC и Alexa 647, в качестве источника возбуждающих волн использовали светодиодные лазеры с длинами волн 405, 488, 640 нм соответственно. Сканирование вдоль Z-оси выполняли с шагом 0.8 мкм. Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения конфокального микроскопа Olympus FV3000. Трехмерную реконструкцию на основе полученных оптических срезов производили с помощью встроенных функций программного обеспечения микроскопа Olympus FV3000. В каждом эксперименте анализировали изображения не менее 3 ооцитов.

*Обработка данных конфокальной микроскопии*

Анализ флуоресцентных сигналов проводился с помощью программы ImageJ (NIH, США). Перед обработкой изображения проводилась его калибровка – рассчитывалось соотношение между физическим размером изображения в сантиметрах и числом пикселей в изображении. Перед измерениями все изображения, содержащие флуоресценцию только одного канала (FITC для *HS2/HS3*, Alexa 647 для DDX4) обрабатывались с помощью инструмента Subtract и инструмента Unsharp mask. После этого изображения переводились в цветовой режим оттенка серого (256 оттенков, формат 8-бит). Перед преобразованием в бинарное черно-белое изображение устанавливался порог интенсивности серого цвета с помощью инструмента Threshold, ниже которого серый сигнал считался равным белому, а выше – черному цвету. Далее изображение переводилось в бинарное, которое обрабатывалось с помощью бинарного инструмента Watershed, разделяющего соприкасающиеся объекты. В разделе Set Measurements проводилась настройка условий и набора данных для будущего обсчета. Зона обсчета ограничивалась с помощью инструмента Freehand Selections. Далее с помощью инструмента Analyze Particles проводился обсчет флуоресцентных сигналов. Минимальный размер сигналов, отбираемых для обсчета был установлен на уровне 7 пикселей. В качестве величины, используемой для квантификации флуоресцентного сигнала, был выбран показатель “среднее значение серого” (C3C, mean) – сумма значений всех пикселей серого цвета в выделенной области, деленная на количество пикселей. Данная величина находится в прямой пропорциональной зависимости от количества флуоресцентно-меченных макромолекул и дает представление об интенсивности флуорес-



**Рис. 1.** Пространственное распределение РНК HS2/HS3 (зеленый) и РНК-хеликазы DDX4 (красный) (а–в) в GV и MI ооцитах человека после инъекций физиологического раствора (а), 8.5 фмоль (б) и 12.75 фмоль антисмысловых нуклеотидов (в). Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабная линейка: 20 мкм. Результаты количественного обсчета изображений представлены на графиках (г–е): СЗС для конфокальных изображений после HS2/HS3 РНК FISH (г), после иммуноокрашивания АТ против DDX4 (д). Данные по числу флуоресцентных сигналов на клетку после окрашивания АТ к DDX4 представлены на (е).

пении. При исследовании флуоресценции АТ против DDX4 также использовались данные о количестве отдельных сигналов (count). Результаты обсчета выводились в виде таблицы результатов.

#### Статистический анализ

Эксперименты проводились не менее чем в 3 биологических и 5 технических повторностях. Статистическая обработка данных обсчета СЗС проводилась с использованием программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Был выполнен односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) для попарного сравнения средних значений трех несогласованных групп. Использование *t*-критерия было исключено из-за малого размера выборок. Для таких выборок ANOVA является одним

из рекомендованных методов статистического анализа, благодаря устойчивости его результатов к изменению размеров выборок (Blanca et al., 2017). Статистическая значимость обозначена \*\* при *p*-value < 0.01 и ns при *p* > 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установили, что инъекционные манипуляции с ооцитами не приводили к достоверному увеличению числа дегенерировавших ооцитов ни в одной из групп по сравнению с внутрилабораторными контрольными значениями гибели ооцитов при инъекционных манипуляциях. Данные внутрилабораторные нормы были установлены клиникой, в которой проводились мик-

роинъекции в рамках данного исследования, на основании собственного и мирового опыта.

В ооцитах 3-й группы, получивших 12.75 фмоль 2-О'Мет ДНК, наблюдалось достоверное ( $p = 0.01$ ) снижение СЗС до  $25.68 \pm 1.777$  по сравнению с группой 1 ( $35.50 \pm 2.938$ ). В группе с дозой 8.5 фмоль данный показатель ( $34.47 \pm 1.984$ ) не изменялся достоверно по сравнению с контрольной группой (рис. 1а–1г).

Таким образом, данный метод инактивации ТП ДНК приводит к статистически достоверной инактивации ~30% исследуемых транскриптов сателлитной ДНК. Инактивация транскриптов перичентромерных ТП ДНК человека на данный момент является технически сложной задачей. Это обусловлено несколькими факторами. Во-первых, на данный момент сложно подобрать инактивирующие олигонуклеотиды, т.к. сборка генома в области локализации перичентромерных ТП ДНК отсутствует. Инактивация же транскриптов в ооцитах представляет дополнительные трудности — из-за наличия сформированной *zona pellucida* невозможно использовать для трансфецирования липофильные реагенты. Блок транскрипции на завершающем этапе GV стадии развития ооцитов также снижает эффективность инактивации. В данном исследовании нам удалось добиться значимого снижения СЗС гибридационных сигналов в ДНК-РНК FISH и показать хорошую переносимость клетками данной процедуры. Для повышения эффективности инактивации планируется разработка протокола с использованием одновременно нескольких антисмысловых олигонуклеотидов.

Одновременно с этим, в ооцитах 3-й группы была обнаружена тенденция ( $p = 0.16$ ) увеличения СЗС в канале, соответствующем сигналу, полученному при окрашивании АТ против DDX4 до  $26.23 \pm 2.223$  по сравнению с группой 1 ( $19.57 \pm 2.496$ ). При этом в группе 2 данный показатель ( $21.63 \pm 3.095$ ) изменялся меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 1а–1в, 1д).

При этом в ооцитах 3-й группы была обнаружена тенденция ( $p = 0.19$ ) к увеличению числа отдельных сигналов до  $76 \pm 18.56$  по сравнению с группой 1 ( $44 \pm 8.994$  сигналов). Тогда как в группе 2 данный показатель ( $26 \pm 5.508$  сигналов) изменялся меньше по сравнению с контрольной группой 1 (рис. 1а–1в, 1е). Малый размер выборки не позволил получить статистически достоверные данные. Работа по накоплению данных будет продолжена в будущем.

Таким образом, при снижении количества транскриптов *HS2/HS3* в ооците, количество включений, окрашиваемых антителами к DDX4, увеличилось без снижения СЗС.

Возможно, при инактивации транскрипции *HS2/HS3*, происходит диссоциация ранее обнаруженных DDX4-содержащих РНП частиц, так как выявлено увеличение количества отдельных сигналов, соответствующих DDX4. Предполагается, что обнаруженные РНП необходимы для депонирования материнских РНК и белков, используемых в процессах раннего эмбриогенеза до запуска собственного генома эмбриона. В связи с этим, диссоциация РНП частиц может играть критическую роль для развития ооцитов, быть причиной остановки созревания или возникновения патологических синдромов, в том числе связанных с проблемами оплодотворения.

Известно, что РНК могут являться активными участниками-регуляторами, а не пассивными элементами при образовании РНП гранул. *In vitro* небольшое количество РНК сначала способствует образованию капелек белка, а затем начинает растворять капли, как только концентрация РНК достигает порогового значения (Banerjee et al., 2017; Maharana et al., 2018). Длинные и трансляционно-репрессированные (экспонированные) транскрипты имеют тенденцию входить в состав РНП (Rangan et al., 2009; Hubstenberger et al., 2013; Namkoong et al., 2018). Эти РНК могут иметь больше конформационных состояний, чем трансляционно активные РНК (Ding et al., 2005), а также могут участвовать в большем количестве взаимодействий белок-РНК, РНК-РНК или участвовать в спаривании оснований (Jain, Vale, 2017; Rhine et al., 2020). Таким образом, структура РНК является одним из основных регуляторов разделения фаз различных РНП структур, а инактивация их транскрипции может приводить к дезорганизации РНП.

Известно, что РНК *HS2/HS3*, ранее выделенная из клеток HeLa, подвергшихся тепловому шоку (Valgardsdottir et al., 2005), необходима для сборки ядерных стресс телец — безмембранных РНП, связанных с ТП ДНК. Предполагается, что подобные *HS2/HS3* РНК обладают исключительной способностью действовать как молекулярные губки и секвестрировать регуляторные белки хроматина (Erukashvily et al., 2021). Поэтому инактивация транскрипции *HS2/HS3* может быть фактором, оказывающим негативное влияние на сборку РНП структур.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что 2-О'Мет антисмысловые олигонуклеотиды могут инактивировать транскрипцию сателлитных *HS2/HS3* ДНК в позднем оогенезе человека при введении их в клетку путем микроинъекций. При инактивации транскриптов наблюдается

снижение степени агрегации белка DDX4 содержащегося в составе РНП, что может свидетельствовать о диссоциации РНП.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и гранта РНФ (№ 19-74-20102) (сбор ооцитов, дизайн антисмысловых праймеров).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Разработка концепции исследования, планирование экспериментов: Н.И. Енукашвили, Н.М. Корчагина, М.А. Добрынин; проведение экспериментов: М.А. Добрынин, Н.В. Корчагина; методология: Н.М. Корчагина, Н.В. Пономарцев, Н.И. Енукашвили; визуализация: М.А. Добрынин; финансовое обеспечение: О.И. Подгорная, Н.И. Енукашвили; подготовка рукописи: М.А. Добрынин, Н.И. Енукашвили.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добрынин М.А., Енукашвили Н.И.* Зародышевые гранулы в оогенезе животных // *Цитология*. 2020. Т. 62. № 12. С. 851–866.
- Трофимова И.Л., Енукашвили Н.И., Кузнецова Т.В., Баранов В.С.* Транскрипция сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека: обзор литературы и собственные данные // *Медицинская генетика*. 2018. Т. 17. № 3. С. 3–7.
- Banerjee P.R., Milin A.N., Moosa M.M., Onuchic P.L., Deniz A.A.* Reentrant phase transition drives dynamic substructure formation in ribonucleoprotein droplets // *Angew. Chemie – Int. Ed.* 2017. V. 56. № 38. P. 11354–11359. <https://doi.org/10.1002/anie.201703191>
- Blanca M.J., Alarcón R., Arnau J., Bono R., Bendayan R.* Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? // *Psicothema*. 2017. V. 29. № 4. P. 552–557. <https://doi.org/10.7334/PSICOTHEMA2016.383>
- De Smedt V., Szöllösi D., Kloc M.* The Balbiani body: Asymmetry in the mammalian oocyte // *Genesis*. 2000. V. 26. № 3. P. 208. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1526-968x\(200003\)26:3<208::aid-gene6>3.3.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1526-968x(200003)26:3<208::aid-gene6>3.3.co;2-e)
- Ding Y., Chi Y.C., Lawrence C.E.* RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble // *RNA*. 2005. V. 11. № 8. P. 1157–1166. <https://doi.org/10.1261/RNA.2500605>
- Dobrynin M.A., Korchagina N.M., Prjibelski A.D., Shafranskaya D., Ostromyshenskii D.I., Shunkina K., Stepanova I., Kotova A.V., Podgornaya O.I., Eukashvily N.I.* Human pericentromeric tandemly repeated DNA is transcribed at the end of oocyte maturation and is associated with membraneless mitochondria-associated structures // *Sci. Reports*. 2020. V. 10. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76628-8>
- Eukashvily N.I., Dobrynin M.A., Chubar A.V.* RNA-seeded membraneless bodies: Role of tandemly repeated RNA // *In Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* Academic Press Inc. 2021. V. 126. P. 151–193. ISSN 1876-1623. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.12.007>
- Eukashvily N.I., Ponomartsev N.V.* Mammalian satellite DNA: a speaking dumb // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2013. V. 90. P. 31–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410523-2.00002-X>
- Hubstenberger A., Noble S.L., Cameron C., Evans T.C.* Translation repressors, an RNA helicase, and developmental cues control RNP phase transitions during early development // *Dev. Cell*. 2013. V. 27. № 2. P. 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.024>
- Jain A., Vale R.D.* RNA phase transitions in repeat expansion disorders // *Nat.* 2017. V. 546. № 7657. P. 243–247. <https://doi.org/10.1038/nature22386>
- Lennox K.A., Behlke M.A.* Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides // *Gene Ther.* 2011. V. 18. № 12. P. 1111–1120. <https://doi.org/10.1038/GT.2011.100>
- Maharana S., Wang J., Papadopoulos D.K., Richter D., Pozniakovskiy A., Poser I., Bickle M., Rizk S., Guillén-Boixet J., Franzmann T.M., Jahnel M., Marrone L., Chang Y.T., Sternecker J., Tomancak P., Hyman A.A., Alberti S.* RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins // *Science*. 2018. V. 360. № 6391. P. 918–921. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR7366>
- Namkoong S., Ho A., Woo Y.M., Kwak H., Lee J.H.* Systematic characterization of stress-induced RNA granulation // *Mol. Cell*. 2018. V. 70. № 1. P. 175–187.e8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.02.025>
- Rangan P., DeGennaro M., Jaime-Bustamante K., Coux R.-X., Martinho R., Lehmann R.* Temporal and spatial control of germ-plasm RNAs // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 1. P. 72–77. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.11.066>
- Reunov A.A., Reunova Y.A.* In mouse oocytes the mitochondrion-originated germinal body-like structures accumulate mouse Vasa homologue (MVH) protein // *Zygote*. 2015. V. 23. № 4. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000124>
- Rhine K., Vidaurre V., Myong S.* RNA droplets // *Annu. Rev. Biophys.* 2020. V. 49. P. 247. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-052118-115508>
- Richard G.-F., Kerrest A., Dujon B.* Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. № 4. P. 686–727. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-08>
- Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G.* Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stressed human cells // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16. № 6. P. 2597–2604. <https://doi.org/10.1091/MBE.E04-12-1078/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0060571650005.JPEG>
- Yandlm C., Karakulah G.* Expression dynamics of repetitive DNA in early human embryonic development // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-5803-1>

## Influence of Inactivation of Tandemly Repeated Pericentromeric DNA Transcription on the Formation of Membraneless Structures at the End of Oocyte Maturation

M. A. Dobrynin<sup>1, \*</sup>, N. M. Korchagina<sup>2, 3</sup>, N. V. Ponomartsev<sup>1</sup>,  
O. I. Podgornaya<sup>1</sup>, and N. I. Erukashvily<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology of RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>2</sup> Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

\*e-mails: [dobrmak1555@mail.ru](mailto:dobrmak1555@mail.ru)

\*\*e-mails: [n.erukashvily@incras.ru](mailto:n.erukashvily@incras.ru)

Pericentromeric tandemly repeating noncoding DNA (TR DNA) makes up approximately 10% of the human genome. TR DNA includes classic human satellites 1, 2, 3 (*HS1*, *HS2*, *HS3*), which are transcribed in somatic cells. We have previously shown the presence of *HS2/HS3* transcripts in late human oogenesis and determined their sequence. It has been suggested that the RNPs may be the site of spatial sequestration of RNA and proteins in maturing oocytes. The aim of this work was to develop a method for the inactivation of *HS2/HS3* transcripts using microinjected oligonucleotides to assess its effect on the size and amount of DDX4-containing RNP in maturing human oocytes. Inactivation of *HS2/HS3* transcription in maturing human oocytes by microinjection led to a significant decrease in the total *HS2/HS3* RNA signal after FISH. At the same time, an increase in the number of inclusions stained with antibodies to RNA helicase DDX4 was observed. Possibly, upon inactivation of *HS2/HS3* transcription, dissociation of previously detected DDX4-containing RNP particles occurred. Such changes in the RNP of particles can play a critical role in the development of oocytes, be a reason for the arrest of maturation or the occurrence of pathological syndromes, including those associated with fertilization problems.

**Keywords:** oogenesis, embryogenesis, *HS2/HS3*, DDX4, germ granules, membraneless biomolecular condensates

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
“Актуальные проблемы биологии развития”  
12–14 октября 2021 г., Москва,  
Институт биологии развития РАН

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ГИСТОНОВОЙ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ HDAC (БЕЛИНОСТАТА) НА ЭКСПРЕССИЮ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. А. Акишина<sup>а</sup>, Р. О. Черезов<sup>а</sup>, Ю. Е. Воронцова<sup>а, \*</sup>, О. Б. Симонова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: vorontsova@idbras.ru

Поступила в редакцию 12.11.2021 г.

После доработки 22.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) является высококонсервативным лиганд-зависимым транскрипционным фактором, гены-мишени которого играют ключевую роль в детоксикации, регуляции процессов развития, поддержании гомеостаза эукариот и метаболизме лекарственных соединений. Наше исследование впервые демонстрирует увеличение экспрессии гена арил-гидрокарбонного рецептора и его генов-мишеней в культурах клеток человека после воздействия ингибитора гистоновой деацетилазы (белиностата), который рассматривают в настоящее время как возможное терапевтическое средство для лечения различных типов глиом, в том числе и глиобластом.

**Ключевые слова:** арил-гидрокарбонный рецептор AHR, гистоновая деацетилаза HDAC, белиностат, *Cyp1A1*, *Cyp1B*

**DOI:** 10.31857/S0475145022020021

### ВВЕДЕНИЕ

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) является высококонсервативным лиганд-зависимым цитозольным транскрипционным фактором. Гены-мишени AHR играют ключевую роль в регуляции процессов развития, детоксикации и поддержания гомеостаза эукариот. Наиболее изученными генами-мишенями AHR являются гены, кодирующие ферменты системы цитохрома р450 (CYP), которые участвуют в метаболизме гормонов и лекарственных соединений. Известно, что для многих опухолевых клеток характерно изменение соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности по сравнению с неопухолевыми, что может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

Попадая в цитоплазму клетки, лиганд взаимодействует с AHR, который далее перемещается в ядро, где вместе с ARNT (AHR Nuclear Translocator)

формирует транскрипционный комплекс для активации генов-мишеней.

Ранее, в экспериментах *in vivo*, мы показали, что разнообразие уровней транскрипции генов-мишеней AHR обусловлено структурой хроматина каждого из них (Akishina et al., 2017). Нами был обнаружен механизм контроля индуцибельной экспрессии генов-мишеней AHR, который заключается в том, что внешний сигнал (лиганд), активирующий AHR как транскрипционный фактор, не всегда вызывает эффективный ответ его генов-мишеней. Этот ответ будет эффективным только в случае доступности ДНК регуляторных областей генов-мишеней для AHR, т.е. зависит от статуса хроматина этих областей, который может меняться в разных тканях и на разных стадиях развития организма (Akishina et al., 2017; Акишина и др., 2020).

Целью настоящей работы было проанализировать, существует ли механизм эпигенетического контроля индуцибельной экспрессии генов-мишеней AHR в клетках человека опухолевого и не-

опухолевого происхождения, поскольку ингибиторы гистоновых модификаторов и лиганды АНР часто используются при лечении разных типов рака (Howells et al., 2002; Wang et al., 2017; Gurbani et al., 2019). Белиностат, ингибитор гистоновой деацетилазы HDAC, не так давно начали рассматривать, как возможное терапевтическое средство для лечения различных типов глиом, в том числе и глиобластом (Kusaczuk et al., 2016; Gurbani et al., 2019). В данной работе мы исследовали влияние белиностата на индукцию лигандами АНР экспрессии его генов-мишеней семейства *CYP1* (*CYP1A1*, *CYP1B*), уровень экспрессии самого гена *AHR* и его партнера, *ARNT*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа использовали клетки эмбриональных почек человека линии HEK293 и опухолевые клетки глиобластомы человека Sus/fP2 (Pustogarov et al., 2017), любезно предоставленные сотрудниками лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Для культивирования клеток использовали клеточную среду DMEM/F12, содержащую 10% FBS, с добавлением 2 мМ L-глутамин и 19.4 мМ D-глюкозы (ПанЭко, Россия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для проведения экспериментов клетки рассевали на 6-ти луночные планшеты и инкубировали 24 ч, после чего в клеточную среду добавляли лиганды, либо белиностат или лиганды плюс белиностат на 24 ч. Все эксперименты были проведены в трех повторностях. Лиганды и белиностат растворяли в ДМСО для получения стоковой концентрации: 10 мкМ для 2'Z-индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия) и 2 мМ белиностата (PXD101, Sigma-Aldrich, США). Далее лиганды добавляли в среду в конечной концентрации: 10 нМ индирубин, 100 мкМ индол-3-карбинол и 2 мкМ белиностат. В качестве контроля в среду добавляли эквивалентное количество ДМСО.

Изменения экспрессии генов оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Протоколы выделения РНК, синтеза кДНК и проведения ПЦР в реальном времени описаны ранее (Воронцова и др., 2020).

В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой – TGCACCACCAACTGCTTAGC, обратный – GGCATGGACTGTGGTTCATGAG; для гена *HPRT1*: прямой – TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, обратный – GAGCACACAGAGGGC-TACAA; для гена *AHR*: прямой – GAACCATC-CCCATACCCAC, обратный – TGGCTGG-CACTGATACATCG; для гена *ARNT*: прямой – GAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAG, обрат-

ный – AGGAGTCACGGAGTCAGACACATA; для гена *CYP1A1*: прямой – GATTGAGCACTGT-CAGGAGAAGC, обратный – CCAAAGAGGGT-CAAGACGATGTTA; для гена *CYP1B*: прямой – CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC, обратный – AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT. Гены *HPRT1* и *GAPDH* использовали в качестве референсных.

Все результаты представлены как среднее значение ±SEM. Различия считались значимыми при p-value менее 0.05. Статистическая значимость различий между образцами для экспериментов оценивалась с помощью программного обеспечения REST (Qiagen, США) (Pfaffl et al., 2002) с использованием парного теста рандомизации с фиксированным перераспределением с 2000 перестановок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

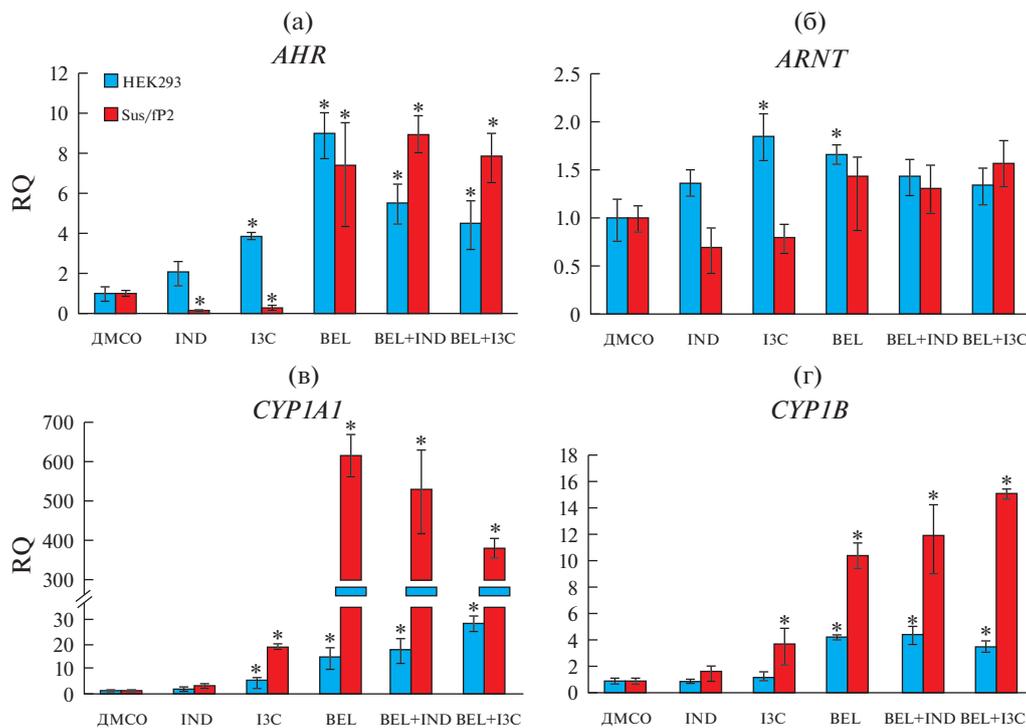
Применение индирубина и индол-3-карбинола по-разному влияло на экспрессию исследуемых генов. Экспрессия гена *CYP1A1* при добавлении индирубина увеличивалась незначительно по сравнению с контролем (рис. 1в). После добавления индол-3-карбинола уровень экспрессии *CYP1A1* увеличивался значительно, в 4.5 и в 19 раз, в клетках линии неопухолевого происхождения HEK293 и в клетках глиобластомы Sus/fP2 соответственно. Уровень экспрессии гена *CYP1B* повышался только при добавлении индол-3-карбинола в клетках Sus/fP2 (рис. 1г).

*CYP1A1* и *CYP1B* являются генами-мишенями лиганд-зависимого транскрипционного фактора АНР. Повышение уровня экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B* в ответ на действие лигандов АНР указывает на нормальное функционирование пути *AHR/CYP1* в исследуемых клеточных культурах.

Что интересно, воздействие лигандов также приводило к увеличению экспрессии самого *AHR* в клетках линии HEK293 и к значительному снижению экспрессии в клетках линии Sus/fP2 (рис. 1а). Тогда как на экспрессию *ARNT* применение лигандов практически не оказывало эффекта (рис. 1б).

Добавление к культивируемым клеткам белиностата, который является ингибитором гистоновой деацетилазы HDAC, приводило к активации транскрипции *AHR* и усилению экспрессии всех исследуемых генов, кроме *ARNT*. Возможно, HDAC не участвует в регуляции активности промотора гена *ARNT* в клетках исследуемых культур. Для гена *AHR* было показано, что ингибиторы HDAC могут усиливать конститутивную активность его промотора, тем самым повышая уровень его экспрессии (Garrison et al., 2000), что подтверждается нашими данными.

Самое значительное (в 600 раз) повышение экспрессии было зафиксировано для гена *CYP1A1* в клетках глиобластомы. Интересно, что белино-



**Рис. 1.** Уровень экспрессии генов *CYP1A1*, *CYP1B*, *AHR* и *ARNT* в клетках линии неопухолевого происхождения HEK293 и глиобластомы Sus/fP2 до (контроль) и после добавления лигандов (индирубина, индол-3-карбинола) и белиноста, ингибитора гистоновой деацетилазы HDAC. Уровень экспрессии генов *AHR* (а), *ARNT* (б), *CYP1A1* (в), *CYP1B* (г). Звездочка указывает на значимое различие в экспрессии генов по сравнению с контролем ( $* p \leq 0.05$ ). RQ – относительный уровень мРНК. DMCO – контроль, IND – индирубин, I3C – индол-3-карбинол, Bel – белиноста.

стат значительно сильнее влиял на уровень экспрессии генов-мишеней *AHR* в клетках глиобластомы Sus/fP2, чем в клетках неопухоловой культуры HEK293.

Менее выраженный рост уровня экспрессии *AHR* и его генов-мишеней в ответ на действие белиноста в культуре HEK293 по сравнению с культурой глиобластомы, можно объяснить особенностями клеток HEK293 и ткани, из которой они получены. Как было показано ранее, изменение паттерна экспрессии, инициированное во время воздействия белиноста, может сильно зависеть от типа опухолевых клеток (Kusaczuk et al., 2016).

Таким образом, в клетках опухолевого и неопухолевого происхождения, в которых работает путь *AHR/CYP1*, способность генов-мишеней реагировать на активацию *AHR* индирубином и индол-3-карбинолов зависит от статуса хроматина их регуляторных зон и активности эпигенетических факторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм и принцип действия белиноста на данный момент понятен не до конца, хотя известно, что он является ингибитором гистоновой деа-

цетилазы HDAC, которая подавляет экспрессию генов на эпигенетическом уровне через модификацию гистонов промоторных областей. Однако, до сих пор не выявлен полный спектр генов, экспрессию которых белиноста может контролировать в опухолевых и неопухоловых клетках. Тем не менее известно его прямое влияние на экспрессию генов, чьи продукты ответственны за арест клеточного цикла и апоптоз, что важно для онкотерапии (Kusaczuk et al., 2016). В данной работе мы показали, что белиноста также активирует экспрессию гена *AHR* и двух его генов-мишеней в клетках глиобластомы, усиливая действие лигандов *AHR*. Так как лиганды *AHR* и эпигенетические ингибиторы используются в противоопухолевой терапии разных видов рака, в том числе глиобластом (Sherer et al., 2017), результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Дмитрию Юрьевичу Пантелееву, сотруднику Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, за помощь в проведении экспериментов и сотрудникам лаборато-

рии нейрогенетики и генетики развития Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН за предоставление клеточных линий. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2024-0008.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акишина А.А., Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О. и др.* Эпигенетическая модуляция транскрипции генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора человека в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // Биомика. 2020. Т. 12. № 4. С. 504–509.
- Воронцова Ю.Е., Акишина А.А., Черезов Р.О. и др.* Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2020. Т. 75. № 4. С. 291–295.
- Akishina A., Vorontsova J., Cherezov R. et al.* Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 61. P. 102934–102947.
- Garrison P.M., Rogers J.M., Brackney W.R. et al.* Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 374. № 2. P. 161–171.
- Gurbani S.S., Yoon Y., Weinberg B.D. et al.* Assessing treatment response of glioblastoma to an HDAC inhibitor using whole-brain spectroscopic MRI // *Tomography*. 2019. V. 5. № 1. P. 53–60.
- Howells L.M., Gallacher-Horley B., Houghton C.E. et al.* Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line // *Mol. Cancer. Ther.* 2002. V. 1. № 13. P. 1161–1172.
- Kusaczuk M., Krętowski R., Stypułkowska A. et al.* Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor – belinostat – in glioblastoma cell lines: a preliminary report // *Invest. New Drugs*. 2016. V. 34. № 5. P. 552–564.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.* Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 9. P. e39.
- Pustogarov N., Panteleev D., Goryaynov S. et al.* Hiding in the shadows: CPOX expression and 5-ALA induced fluorescence in human glioma cells // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 5699–5708.
- Sherer C., Tolaymat I., Rowther F. et al.* Preliminary SAR on indole-3-carbinol and related fragments reveals a novel anticancer lead compound against resistant glioblastoma cells // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. № 7. P. 1561–1565.
- Wang Y., Hoi P.M., Chan J.Y.-W. et al.* New perspective on the dual functions of indirubins in cancer therapy and neuroprotection // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2014. V. 14. № 9. P. 1213–1219.

## Effect of the Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor – Belinostat – on the Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Target Genes in Human Cell Cultures

A. A. Akishina<sup>1</sup>, R. O. Cherezov<sup>1</sup>, J. E. Vorontsova<sup>1</sup>, \*, and O. B. Simonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

\*e-mail: vorontsova@idbras.ru

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor. Its target genes play an important role in detoxification, developmental regulation, maintenance of eukaryotic homeostasis, and drug metabolism. The results of our study have shown for the first time the increase in the expression of the aryl hydrocarbon receptor and its target genes in human cell cultures after exposure to a histone deacetylase inhibitor (belinostat), which is currently considered a potential therapeutic agent for the treatment of various types of gliomas, including glioblastoma.

**Keywords:** aryl hydrocarbon receptor AHR, histone deacetylase HDAC, belinostat, *Cyp1A1*, *Cyp1B*

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
“Актуальные проблемы биологии развития”  
12–14 октября 2021 г., Москва,  
Институт биологии развития РАН

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА TOOTHNRIN ИЗ РОДСТВЕННОГО СЕМЕЙСТВА D4 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2022 г. Е. Е. Куваева<sup>а</sup>, Д. А. Куликова<sup>а</sup>, О. Б. Симонова<sup>а</sup>\*, И. Б. Мерцалов<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

В работе впервые исследовали картину экспрессии белка ТТН, родственного семейству белков D4, на личиночной стадии развития *Drosophila melanogaster*. Для этого были получены поликлональные антитела к нативному белку ТТН и синтезирована линия дрозофил, трансформированных генетической конструкцией, содержащей модифицированный локус *tth* для экспрессии GFP-меченого белка ТТН::GFP. Анализ картин экспрессии нативного и меченого белков показал локализацию ТТН в нервной системе, специализированных эндокринных железах и слюнных железах личинок, а также в структурах, формирующих иннервацию глаз взрослого насекомого. Было сделано предположение об участии гена *tth* в развитии нервной системы и зрительного анализатора, а также в функционировании органов, ответственных за гормональную регуляцию и пищеварение.

**Ключевые слова:** семейство генов *d4*, трансгенная конструкция, гибридный белок, нервная система, GFP, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145022020070

### ВВЕДЕНИЕ

Ген *toothrin* (*tth*) относится к эволюционно консервативному семейству генов *d4*. У позвоночных животных семейство представлено тремя генами, два из которых дифференциально экспрессируются в центральной и периферической нервной системе (Kulikova et al., 2013). У дрозофилы обнаружено два гена-гомолога этого семейства, но только один из них (*drosophila d4 – dd4*) кодирует белок с характерным С-концевым доменом парных цинковых пальцев РНД-типа, или D4-доменом (DPF). Было показано, что D4-домен белка DPF3/Сег-D4 человека способен связываться с метилированными и ацетиленованными остатками лизинов гистонов 3 и 4 (Lange et al., 2008). Ранее мы показали специфический паттерн экспрессии мРНК гена *dd4* в нервной системе и гонадах эмбрионов дрозофилы (Nabirochkina et al., 2002). Другой ген – *tth* – является особенным геном, кодирующим белок без домена D4, но с доменом 2/3, который также есть у D4-белков. Однако паттерн экспрес-

сии ТТН исследован не был. По литературным данным, домен 2/3 белка DPF3 семейства D4 человека играет роль коактиватора транскрипции в сигнальном пути NF-κB, который участвует в воспалительном ответе, пролиферации клеток и апоптозе (Ishizaka et al., 2012). Наличие гена, кодирующего белок только с доменом 2/3, дает возможность изучать роль этого домена и самого гена в онтогенезе на модельном организме *Drosophila melanogaster*.

Цель нашей работы состояла в изучении картины экспрессии белка ТТН на личиночной стадии развития дрозофилы в имагинальных дисках и нервной системе. Для этого мы получили специфические к ТТН антитела. Дополнительно, для более точного детектирования и визуализации продуктов его экспрессии *in vivo*, мы получили линию дрозофил, трансформированную генетической конструкцией для экспрессии GFP-меченого белка ТТН.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Получение поликлональных антител к белку ТТН.

Кроликов иммунизировали рекомбинантным белком, который состоял из последовательности С-концевых аминокислотных остатков (71 а. к. о.) белка ТТН дрозофилы, полученной в бактериальной системе экспрессии *E. coli* (вектор pET-15b, Novagen). Антитела были очищены с помощью аффинной колонки, синтезированной на основе эпокси-активированной сефарозы 4В (GE healthcare), конъюгированной с рекомбинантным белком ТТН.

2. Синтез конструкции, экспрессирующей гибридный белок ТТН::GFP.

Синтез конструкции, несущей модифицированный ген *tth* мы осуществили в несколько этапов. На первом этапе была получена донорная конструкция. Для этого ген-репортер *GFP* встраивали в плазмидный вектор *pBlueskript*, содержащий клонированный в него ген устойчивости к канамицину, окруженный сайтами *LoxP* для Cre-специфической рекомбинации, и в полученную плазмиду клонировали фрагменты ДНК из области выше и ниже стоп-кодона *tth* (“плечи”). Вторым этапом представлен на рис. 1. Полученную донорную конструкцию встраивали в искусственную бактериальную хромосому ВАС (клон CH322-14C11 из ВАСРАС Resources Center – <https://baspracresources.org>), содержащую локус *tth* в фрагменте геномной ДНК размером 21.195 т. п. о. При встраивании, ген-репортер *GFP* попадает в рамку считывания гена *tth* со стороны 3'-концевой области. Внесение репортерных последовательностей в ВАС-клон проводили согласно протоколу (Venken et al., 2008). С помощью электропорации модифицированный ВАС-клон трансфецировали в клетки DY380. Трансформированные клетки выращивали при 30°C, затем инкубировали при 42°C 15 мин для индукции высокой рекомбинантной активности и делали их электрокомпетентными. Затем клетки электропорировали линеаризованной донорной плазмидной конструкцией для внесения в локус последовательности репортерного гена. Встраивание контролировали по появлению устойчивости к канамицину. Далее ген устойчивости к канамицину удаляли рекомбинацией *Cre/Lox* в штамме EL350. Правильность прошедшую рекомбинацию подтверждали с помощью ПЦР соответствующей области и секвенирования ПЦР-фрагмента. В результате модифицированный *tth* кодировал гибридный рекомбинантный белок ТТН::GFP, содержащий GFP на С-конце.

3. Получение трансгенных дрозофил, экспрессирующих гибридный белок ТТН::GFP.

Полученный в описанных выше экспериментах ВАС-клон, имеющий в своем составе сайт *attB* для

сайт-специфической рекомбинации (*attB/attP*) и маркер *miniwhite* для отбора трансформантов дрозофилы, наращивали в клетках EPI300 и выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Cat. no. 12143). ДНК модифицированного ВАС-клона инъецировали в полярную плазму часовых эмбрионов дрозофилы линии *attP2* ( $y^1 w^{67c23}; P\{y^{+17.7}=CaryP\}attP2$  DBSC #8622), мутантных по гену *white* и содержащих сайт *attP* для встраивания по нему *attB*-конструкций с помощью рекомбиназы *PhiC31*. Трансформантов выводили в линию гомозиготных дрозофил и использовали для исследования картины экспрессии гибридного белка ТТН::GFP в тканях и органах личинок.

4. Приготовление препаратов и иммуноокрашивание.

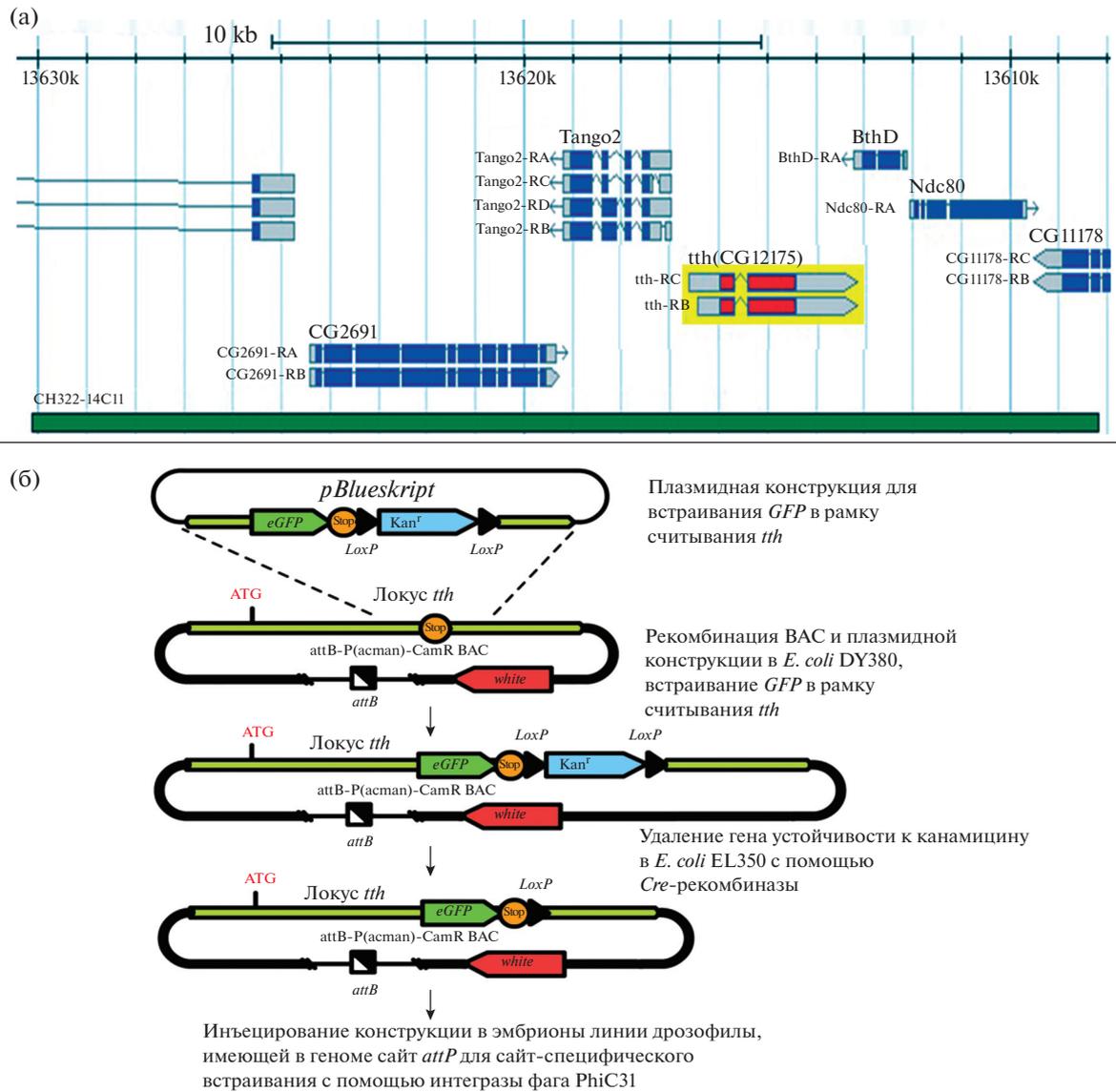
Имагинальные диски, слюнные железы и центральную нервную систему выделяли из личинок третьего возраста в PBS, фиксировали 20 мин в растворе 4% параформальдегида в PBS на льду и отмывали в PBS. Окрашивали препарированные органы личинок третьего возраста, экспрессирующих бактериальную  $\beta$ -галактозидазу гена *lacZ* в глиальных клетках и клетках слюнных желез (*repo>lacZ*). Для окрашивания X-gal использовали реакционную смесь: 3 мМ K<sub>4</sub>[FeII(CN)<sub>6</sub>], 3 мМ K<sub>3</sub>[FeIII(CN)<sub>6</sub>], 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ NaCl, 0.25% X-gal в фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением 0.3% Triton-X100. Развитие окраски наблюдали в течение часа и останавливали, отмывая 3 раза в PBS. Далее проводили иммунохимическое окрашивание антителами к ТТН, конъюгированными с пероксидазой хрена, по протоколу, изложенному в руководстве (Patel, 1994). Первичные кроличьи антитела против ТТН добавляли в разведении 1 : 25. В качестве вторичных использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с HRP (пероксидаза хрена). Для окрашивания HRP добавляли раствор 0.5 мг/мл диаминобензидина (DAB) в PBS с 0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Как негативный контроль использовали линию дрозофил с делецией гена *tth*.

5. Микроскопия.

Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscope 40 в проходящем свете после иммунохимического окрашивания, и с использованием флуоресцентных светофильтров при длине волны 509 для препаратов с GFP-флуоресценцией.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

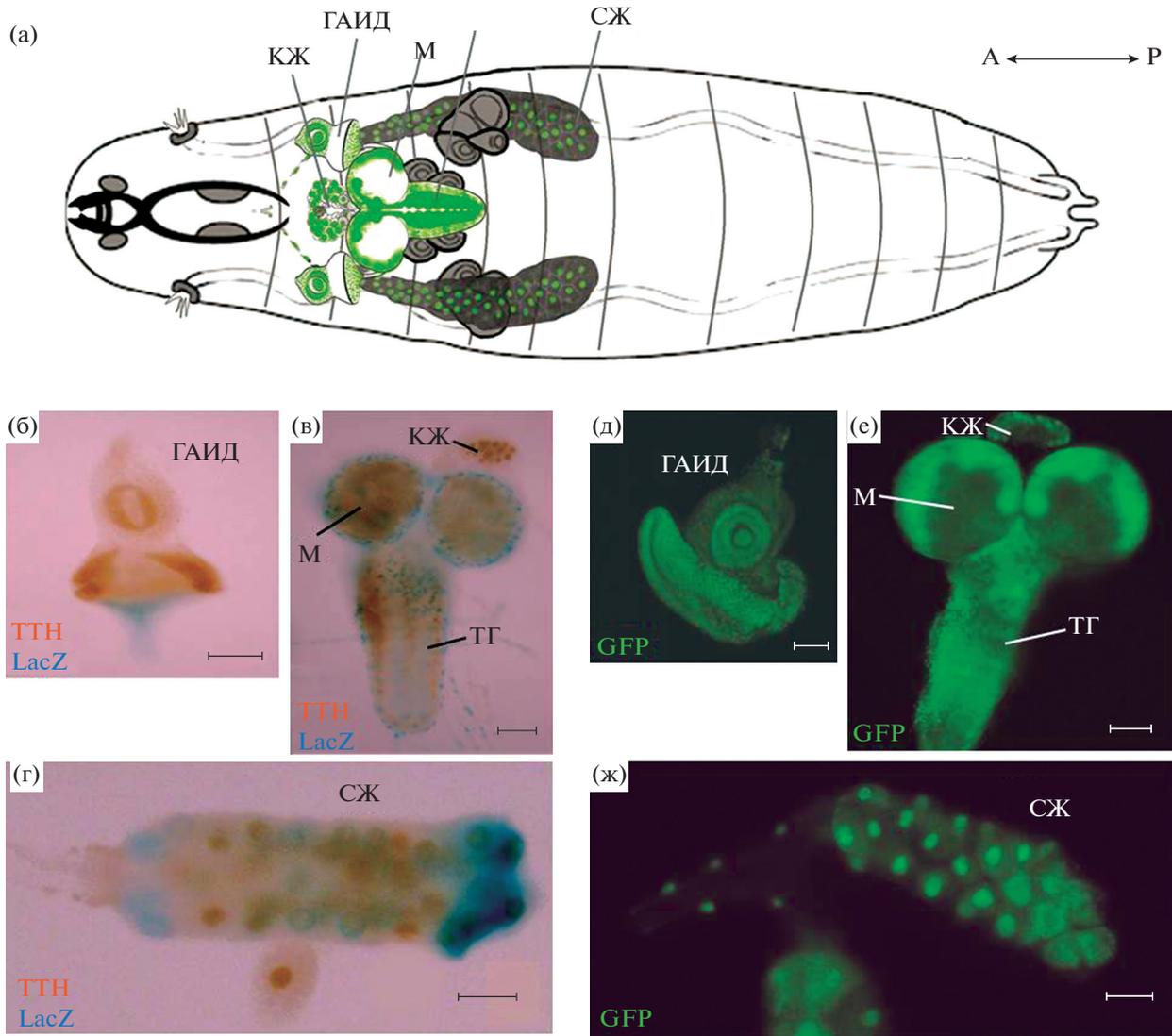
Сначала особенности экспрессии ТТН изучали с помощью иммунохимического окрашивания с использованием полученных нами специфических антител против ТТН. Оказалось, что белок локализован в ядрах клеток глазо-антенного има-



**Рис. 1.** Локализация гена *tth* и схема синтеза конструкции ТТН::GFP. (а) Район локализации гена *tth* (выделен красным) на геномной карте *D. melanogaster*, взятой из P[acman] Genome Browser (<https://bacpacresources.org>). CH322-14C11 – границы BAC (CH322-14C11) (выделены зеленым); (б) схема создания конструкции для экспрессии белка ТТН, несущего С-концевую модификацию GFP. *attB-P(acman)-CamR BAC* – бактериальная искусственная хромосома BAC (CH322-14C11), транскрибируемая область гена *tth* выделена зеленым. Обозначения: *attB* – сайт для сайт-специфической рекомбинации с *attP* сайтом, *eGFP* – зеленый флуоресцентный белок, *white* – маркерный ген, ответственный за пигментацию глаз дрозофилы, *Kan<sup>r</sup>* – ген устойчивости к канамицину, *LoxP* – сайт для Cre-рекомбиназы, оранжевым кругом обозначен стоп-кодон.

гинального диска, нервной системы (мозг и торакальный ганглий), и в личиночных секреторных органах: в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. В своих экспериментах мы использовали личинок, экспрессирующих ген *lacZ* в глиальных клетках (*repo>LacZ*). Это позволило сравнить картины экспрессии ТТН и β-галактозидазы (продукт *LacZ*) в нервной системе. Оказалось, что паттерн экспрессии белка ТТН не совпадает с экспрессией β-галактозидазы (рис. 2б–2г). Это говорит о том, что белок ТТН экспрессируется в основном в нейронах.

Тем не менее, в тканях с низкой экспрессией белка окраска антителами не всегда эффективна. Чтобы это предусмотреть, мы провели дополнительные эксперименты по получению линии трансгенных дрозофил, экспрессирующих GFP-меченый гибридный белок ТТН::GFP (Материалы и методы). Флуоресцентные белки широко используются как репортеры для высокочувствительного молекулярного анализа *in vitro* и *in vivo*. Для этого, на основе бактериальной искусственной хромосомы (BAC), мы получили генети-



**Рис. 2.** Картина экспрессии белка ТТН и гибридного белка ТТН::GFP на личиночной стадии развития *D. melanogaster*. (а) Схема личинки дрозофилы третьего возраста, зеленым отмечена экспрессия ТТН::GFP; (б–г) Иммунохимическое окрашивание антителами против ТТН (коричневый цвет) и окраска X-gal глиальных клеток и слюнной железы личинок *repo*>*LacZ* (голубой); (д–ж) Прижизненная визуализация органов личинки, экспрессирующей белок ТТН::GFP (зеленый). Обозначения: КЖ – кольцевая железа, ГАИД – глазо-антенный имагинальный диск, М – мозг, ТГ – то-ракальный ганглий, СЖ – слюнная железа. Масштабная полоска – 50 мкм.

ческую конструкцию, в которой в одной рамке считывания последовательно располагались участки, кодирующие биоспецифический и репортерный белки (Материалы и методы). Далее мы получили трансгенных дрозофил, несущих модифицированный ген *tth*, экспрессирующий гибридный белок ТТН::GFP (Материалы и методы).

Прижизненная визуализация экспрессии белка ТТН::GFP показала, что его распределение и локализация соответствует результатам, полученным с использованием специфических антител (рис. 2). Это говорит о том, что дополнительный локус *tth* (длиной 22 т. п. о.), функционирует как эндогенный. Мы установили, что ТТН::GFP экс-

прессируется в ядрах клеток слюнных желез, кольцевой железы, хордотональных органах кутикулы, клетках органа Болвига, нейронах зрительной области ЦНС (в нейронах ламины), нейронах центрального нейропиля, а также в глазо-антенном имагинальном диске (дающем начало зрительным и обонятельным органам взрослого насекомого) и глазном стебельке (мембраны аксонов фоторецепторных нейронов).

Таким образом, мы впервые описали паттерн экспрессии белка ТТН у модельного организма *D. melanogaster* и показали, что экспрессия этого белка прежде всего связана с нервной системой и структурами, отвечающими за формирова-

ние зрительного аппарата взрослого насекомого (глазо-антенный диск, орган Болвига, оптические доли мозга), а также с эндокринными (кольцевая и слюнные железы) органами личинок.

Известно, что белки семейства D4 входят в состав хроматин-ремоделирующих SWI/SNF-подобных комплексов BAF, которые по субъединичному составу соответствуют комплексам pBAF млекопитающих (Moshkin et al., 2012). Комплексы pBAF характерны для дифференцированных постмитотических нейронов, но не для нейтральных клеток-предшественников (Lessard et al., 2007). Наши эксперименты показали, что родственный семейству D4 продукт гена *tth*, имеющий в своем составе только домен 2/3, локализуется в нейронах и нейробластах. Локализация нативного ТТН и ТТН::GFP в ядрах клеток подтверждает функциональность сайта ядерной локализации, который характерен для домена 2/3, благодаря чему белки семейства D4 могут транспортироваться в ядро, например, в период развития нервной системы у высших организмов.

Таким образом, на основе наших предварительных данных, можно предположить, что ген *tth* участвует в развитии центральной и периферической нервной системы и, в частности, зрительных органов, а также в развитии и функционировании органов секреции, контролирующими гормональную регуляцию и пищеварение *D. melanogaster*.

В целом, анализ экспрессии ТТН в имагинальных дисках, мозге и органах личинок дрозофилы показал, что этот белок локализован в ядрах нейронов мозга, а также в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. Локализация ТТН в тканях кольцевой железы может свидетельствовать о вовлеченности этого белка в процесс гормональной регуляции развития дрозофилы, что согласуется с нашими ранними данными о влиянии экспрессии *tth* на скорость развития (Симонова и др., 2005). Высокая консервативность белковых доменов семейства D4 дрозофилы позволит экстраполировать их функцию на млекопитающих. У позвоночных животных нет генов, кодирующих белки без домена D4, однако существуют сплайс-варианты гена *cer-d4* (*DPF3*), кодирующие такие их изоформы. По нашим данным (Ninkina et al., 2001), а также по данным MGI (Mouse Gene Expression Database <http://www.informatics.jax.org>), именно этот ген экспрессируется в сетчатке глаза мыши на очень высоком уровне. Для продолжения исследования роли ТТН в развитии и функционировании нервной системы, мы планируем изучить особенности экспрессии ТТН у дрозофилы на фоне известных белковых маркеров нейронов ЦНС, включая нейроны сетчатки зрительных органов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2024-0008.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.Е. Куваева выполняла основную экспериментальную работу, участвовала в обсуждении результатов и написании статьи. Д.А. Куликова участвовала в биохимических экспериментах. О.Б. Симонова инициировала написание статьи, участвовала в обсуждении результатов и редактировала текст. И.Б. Мерцалов планировал и выполнял эксперименты, анализировал результаты и участвовал в написании текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы // Генетика. 2005. Т. 41. № 2. С. 196–202.
- Ishizaka A., Mizutani T., Kobayashi K. et al. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- $\kappa$ B RelA/p50 heterodimer // J. Biol. Chem. 2012. V. 287(15). P. 11924–11933.
- Kulikova D.A., Mertsalov I.B., Simonova O.B. *d4* family genes: Genomic organization and expression // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 1–6.
- Lange M., Kaynak B., Forster U.B. et al. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex // Genes Dev. 2008. V. 22(17). P. 2370–2384.
- Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A. et al. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // Neuron. 2007. V. 55(2). P. 201–215.
- Moshkin Y.M., Chalkley G.E., Kan T.W. et al. Remodelers organize cellular chromatin by counteracting intrinsic histone-DNA sequence preferences in a class-specific manner // Mol. Cell. Biol. 2012. V. 32(3). P. 675–688.

- Nabirochkina E., Simonova O.B., Mertsalov I.B. et al.* Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // *Mech. Dev.* 2002. V. 114. P. 119–123.
- Patel N.H.* Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes // *Methods in Cell Biol.* 1994. V. 44. P. 445–487.
- Venken K.J., Kasprovicz J., Kuenen S. et al.* Recombineering-mediated tagging of *Drosophila* genomic constructs for *in vivo* localization and acute protein inactivation // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36(18). P. e114.

## Studying the Specific Localization of TOOTHTRIN Protein from Related D4 Family in *Drosophila melanogaster*

E. E. Kuvaeva<sup>1</sup>, D. A. Kulikova<sup>1</sup>, O. B. Simonova<sup>1</sup>\*, and I. B. Mertsalov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

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

In this work, the expression pattern of TTH protein, which is related to D4 family of proteins, was studied at the larval stage of *Drosophila melanogaster* development for the first time. To implement this, polyclonal antibodies to the native TTH protein and a *Drosophila* line of flies transformed with a genetic construct containing a modified *tth* locus for expression of the GFP-tagged TTH::GFP protein have been obtained. Analysis of expression patterns of native and labeled proteins showed the localization of TTH in the nervous system, specialized endocrine glands and salivary glands of larvae, as well as in the structures that form the innervation of the eyes of an adult insect. It was suggested that *tth* gene is involved in the development of the nervous and visual systems, as well as in the functioning of the secretion organs that control hormonal regulation and digestion.

*Keywords: d4 gene family, transgenic construct, fusion protein, nervous system, GFP, Drosophila melanogaster*