Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 53 № 3 2022 МАЙ–ИЮНЬ

Журнал основан в 1970 году академиком Б.Л. Астауровым
Выходит 6 раз в год
ISSN: 0475-1450

Журнал издается под руководством
Отделения биологических наук РАН

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»

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 29.12.2021 г. Формат 60 × 88 $^{1}/_{8}$ Усл. печ. л. 9.04 Уч.-изд. л. 9.25
Тираж 21 экз. Зак. 4981 Бесплатно

Учредители: 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 3, 2022

Contents

Vol. 53, No. 3, 2022

REVIEWS

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

MORPHOGENESIS

REGENERATION

POINT OF VIEW

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 163–172

ОБЗОРЫ

УДК 591,3

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2022 г. В. И. Чечехин[a], К. Ю. Кулебякин[a], П. А. Тюрин-Кузьмин[a], *

[a]МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины, Ломоносовский пр-т., 27-1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

Поступила в редакцию 02.12.2021 г.
После доработки 17.01.2022 г.
Принята к публикации 20.01.2022 г.

В основе нормального функционирования взрослого организма лежат механизмы поддержания гомеостаза, регуляции процессов репарации и регенерации тканей. Важную роль в регуляции этих процессов играет особая группа постнатальных стволовых клеток – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). Функциональная активность МСК находится под строгим нейроэндокринным контролем. В данном обзоре рассмотрены особенности механизмов регуляции гормональной чувствительности МСК. Поскольку большинство эндокринных гормонов и нейромедиаторов действует на МСК через G-белок-ассоциированные рецепторы (семидоменные рецепторы), в данной работе фокус делается именно на рассмотрении механизмов регуляции чувствительности с участием таких рецепторов. Механизмы регуляции гормональной чувствительности клеток выстроены в последовательность от самых простых и наиболее хорошо изученных – путем фосфорилирования рецептора – до таких сложных механизмов как регуляция гетерогенной популяции клеток ткани как целого, где выделяются клетки-сенсоры и клетки-эффекторы сигнала.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гормональная регуляция, десенситизация, интернализация, гетеродимеризация, гетерологическая сенситизация

DOI: 10.31857/S0475145022030028

ВВЕДЕНИЕ

В основе поддержания нормального функционирования тканей человека лежит способность большинства тканей и органов к постоянному обновлению и регенерации возникающих повреждений. В целом, появление новых клеток ткани может происходить по одному из трех механизмов: пролиферация уже дифференцированных клеток, деление и дифференцировка стволовых клеток ткани и трансдифференцировка клеток, дифференцированных в другом направлении (Clevers, 2015). Разные ткани организма отличаются преимущественной представленностью одного или другого способа обновления и регенерации. Например, печень регенерирует преимущественно за счет деления терминально дифференцированных клеток паренхимы (Duncan et al., 2009), новые клетки эндотелия в процессе ангиогенеза появляются в результате частичной дедифференцировки и пролиферации имеющихся эндотелиальных клеток (Patan, 2004). Тем не менее, большинство тканей организма обновляется и регенерирует за счет функциональной активности стволовых клеток.

Классически понятие стволовой клетки определяется возможностью дифференцироваться в другие клетки и способностью к самообновлению (Clevers, 2015; Slack, 2018). Более точное определение стволовой клетки включает в себя помимо этих двух признаков также способность к самоподдержанию в течение длительного времени и функционирование в контексте локального микроокружения, которое регулирует активность стволовой клетки (ниша) (Li, Xie, 2005; Терских и др., 2007; Nimiritsky et al., 2019). Тем не менее, и это определение в настоящее время подвергается некоторому пересмотру в связи с тем, что для ряда стволовых клеток, например, нейрональной, стало понятно, что понятие самообновление к ней не применимо. Нейрональные стволовые клетки находятся в покое и практически не делятся. После активации стволовой клетки и начала ее пролиферации и самообновления она превращается в прогениторную клетку, способную к самоподдержанию лишь ограниченное время (Song et al., 2012). Более того, для ряда тканей, например, для крипт тонкого кишечника (в случае стволовых клеток основания крипты) или яичка (в случае смерматогониальной стволовой клетки), невозможно говорить о конкретной физически существующей стволовой клетке, а можно говорить о группе клеток, обладающей стволовой функцией (Klein et al., 2010; Clevers, 2013, 2015).

Важной группой стволовых клеток взрослого организма (постнатальных стволовых клеток) являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). МСК выявляются в большинстве тканей организма и выполняют две ключевые функции. Во-первых, это непосредственно стволовая функция – возможность дифференцироваться в ряд направлений. Во-вторых, крайне важная регуляторная функция. МСК выступают важными регуляторами и координаторами функций ткани, в которой они находятся, формируя и поддерживая строму ткани. Понятие строма в широком смысле включает в себя не только формирование внеклеточного матрикса, окружающего дифференцированные клетки ткани. Под стромой понимается также набор паракринных и контактных регуляторных воздействий, контролирующих функции этих клеток, процессы репарации, регенерации и обновления ткани. МСК ответственны за поддержание гомеостаза, регуляцию процессов ангиогенеза и нейрогенеза, регуляцию иммунных реакций (Калинина и др., 2011).

Функциональная активность стволовых клеток находится под строгим регуляторным контролем нервной и эндокринной систем организма. Действуя через рецепторы, представленные на поверхности клеток, гормоны и нейромедиаторы регулируют такие функции стволовых клеток как пролиферация, миграция, перестройки метаболизма, дифференцировка. Это, в свою очередь, ведет к изменению функционального состояния ткани. С другой стороны и сама гормональная чувствительность клеток и тканей в целом является предметом регуляции, что важно для адаптации систем организма к изменяющимся условиям внешней среды. В настоящее время показано множество различных механизмов регуляции чувствительности клеток к гормонам, однако большинство из них ограничивается модельными объектами, такими как стабильные клеточные линии. Непосредственно на стволовых клетках ведется мало исследований механизмов регуляции гормональной чувствительности в связи с тем, что эти клетки крайне трудны в работе. Постнатальные стволовые клетки в культуре имеют ограниченное время пассирования, при выходе из ниши эти клетки быстро меняют фенотип и коммитируются. Стволовые клетки эффективно защищены от введения в них чужеродного генетического материала. Это ограничивает возможность экспрессии в них экзогенных белков, в частности, генетически-кодируемых биосенсоров для изучения внутриклеточных сигнальных процессов. В связи с этим в настоящее время существует мало работ, фокусирующихся на изучении регуляторных механизмов внутриклеточной синализации именно в постнатальных стволовых клетках. Тем не менее, имеющиеся работы показывают существование в этих клетках уникальных регуляторных механизмов, которые не встречаются в дифференцированных клетках организма.

В данном обзоре будут рассмотрены механизмы регуляции гормональной чувствительности постнатальных стволовых клеток, в первую очередь, МСК. Осознавая, что рецепторы цитокинов и факторов роста, а также внутриклеточные рецепторы представляют огромное множество путей изменения их активности, мы ограничимся рассмотрением механизмов регуляции МСК к гормонам, активирующим G-белок ассоциированные рецепторы (семидоменные рецепторы). Механизмы регуляции гормональной чувствительности клеток мы выстроили в последовательность от самых простых и наиболее хорошо изученных – путем фосфорилирования рецептора – до таких сложных механизмов как регуляция гетерогенной популяции клеток и ткани как целого, где выделяются клетки-сенсоры и клетки-эффекторы сигнала.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ-ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА

В группу процессов, описываемых регуляцией гормональной чувствительности на молекулярном уровне, мы отнесли механизмы, для реализации которых может быть достаточно одной молекулы рецептора в комплексе с активируемыми ею внутриклеточными сигнальными каскадами. Эта группа включает в себя процессы изменения сродства рецептора к гормону, механизмы регуляции сопряжения рецептора и активируемых им внутриклеточных сигнальных каскадов, изменение доступности компонентов сигнальных каскадов для активированного рецептора, а также взаимодействие с другими рецепторами путем гетеро- и гомо-олигомеризации рецепторов.

Давно известным и наиболее хорошо изученным механизмом регуляции сродства семидоменных рецепторов к их лигандам является фосфорилирование их С-концевого цитоплазматического домена. Лиганд-связанный рецептор активирует тримерный G-белок, результатом чего является запуск либо фосфоинозитидного обмена, кальциевой сигнализации и протеинкиназы С (ПКС), либо аденилатциклазы и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который активирует протеинкиназу А (ПКА). ПКС и ПКА могут фосфорилировать цитоплазматический С-концевой домен семидоменных рецепторов, что приводит к снижению сродства рецептора к тримерному G-белку. Как следствие, происходит уменьшение интенсивности активируемых сигнальных каскадов при неизменной концентрации гормона. Поскольку ПКС и ПКА могут активировать как гормон-связанные молекулы рецептора, так и свободные от гормона, этот тип десенситизации называют “независимая от агониста десенситизация” (non-agonist-specific desensitization). Кроме того, этот тип десенситизации часто относят к типу гетерологической десенситизации, поскольку активированные протеинкиназы могут фосфорилировать не только ту молекулу рецептора, которая привела к их активации, но и другие семидоменные рецепторы (Rockman et al., 2002; Gurevich, Gurevich, 2019). Альтернативным путем фосфорилирования активного рецептора является путь гомологической десенситизации, по-иному, “зависимая от агониста десенситизация” (agonist-specific desensitization). При этом активный лиганд-связанный рецептор привлекает киназу G-белок-ассоциированных рецепторов (GRK), которая фосфорилирует только гормон-связанные молекулы рецептора, снижая их сродство к G-белку (Rockman et al., 2002; Gurevich, Gurevich, 2019).

После прохождения десенситизации молекулы рецепторов могут вернуться в исходное состояние путем дефосфорилирования. Протеин-фосфатазы (PP), осуществляющие дефосфорилирование рецепторов, могут находиться как в растворимой форме, так и входить в состав сигнальных супер-комплексов, собирающихся на каркасных белках для проведения сигнала от рецептора. Многие каркасные белки, связывающие цАМФ-зависимую ПКА, (A-kinase-anchoring protein, AKAP), например, AKAP250 Gravin, содержат также и PP2A, дефосфорилирующую рецепторы (Lin et al., 2000). Таким образом, процессы фосфорилирования и дефосфорилирования рецептора осуществляются в связке для тонкой настройки чувствительности рецептора и интенсивности проведения сигнального каскада в соответствии с изменяющимися внешними условиями.

Фосфорилирование семидоменных рецепторов исторически считается ассоциированным с быстрой десенситизацией. Тем не менее, показан ряд механизмов, связанных с фосфорилированием рецепторов, которые приводят к переключению внутриклеточного пути передачи сигнала (рис. 1). В норме β-адренорецепторы взаимодействуют с тримерным G_s-белком и активируют сигнальный каскад аденилат-циклаза/цАМФ/ПКА. Однако в кардиомиоцитах избыточная стимуляция β-адренорецепторов и длительная активация ПКА приводит к фосфорилированию рецептора. Фосфорилированные β-адренорецепторы проявляют повышенное сродство к тримерному G_i-белку (Daaka et al., 1997), что ведет к ингибированию цАМФ-зависимого сигнального каскада, то есть эффекту, противоположному обычному клеточному ответу на стимуляцию β-адренорецепторов. Считается, что в кардиомиоцитах данный феномен участвует в регуляции выживаемости кардиомиоцитов. Избыточная активация цАМФ-зависимого сигнального пути может привести к гибели кардиомиоцитов, тогда как G_i-опосредованная сигнализация компенсирует эти негативные эффекты и повышает выживаемость клеток (Pönicke et al., 2006).

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Фосфорилированный С-концевой домен рецептора связывает каркасный белок β-аррестин, который выполняет несколько функций (рис. 1). Первая – он стерически мешает тримерному G-белку связываться с рецептором, благодаря чему вероятность активации сигнального каскада рецептора становится еще ниже. Вторая – он привлекает белок клатрин, который инициирует процесс интернализации рецептора. Третья – β-аррестин связывает протеинкиназу Raf-1 и активирует MAP-киназный сигнальный каскад, в результате чего происходит переключение сигнализации с классических для семидоменных рецепторов Ca^{2+}-зависимого и цАМФ-зависимого сигнальных каскадов на MAP-киназный, который более характерен для рецепторов факторов роста (Luttrell et al., 2001; Shenoy, Lefkowitz, 2011; Zang et al., 2021). Таким образом, классические механизмы десенситизации на молекулярном уровне включают в себя фосфорилирование рецептора и его уход с поверхности клетки по β-аррестин-зависимому механизму.

МСК широко используют классические способы десенситизации рецепторов, но при этом для разных рецепторов характерна различная чувствительность к стимулам, вызывающим десенситизацию. Так, ранее мы показали, что при действии ангиотензина 2 на МСК происходит крайне быстрая интернализация ангиотензиновых рецепторов AT1R сразу после активации кальциевой сигнализации (Sysoeva et al., 2017). Регистрация кальциевой сигнализации на уровне одиночных клеток показала, что первичная добавка гормона приводит к активации кальциевой сигнализации более чем в 50% клеток популяции. На повторную добавку ангиотензина 2 способны ответить лишь 2–5% клеток популяции. Это связано с тем, что AT1R интернализуется сразу после связывания лиганда (Sysoeva et al., 2017). Более того, в качестве индуктора интернализации рецептора могут выступать и антитела к этому рецептору (Ageeva et al., 2018). β-Адренорецепторы также подвержены интернализации в МСК при избыточном действии норадреналина, но процесс этот осуществляется на протяжении нескольких часов (Tyurin-Kuzmin et al., 2016). α1- и α2-адренорецепторы в МСК не подвергаются десенситизации на протяжении нескольких часов, поскольку повторяющаяся сти-

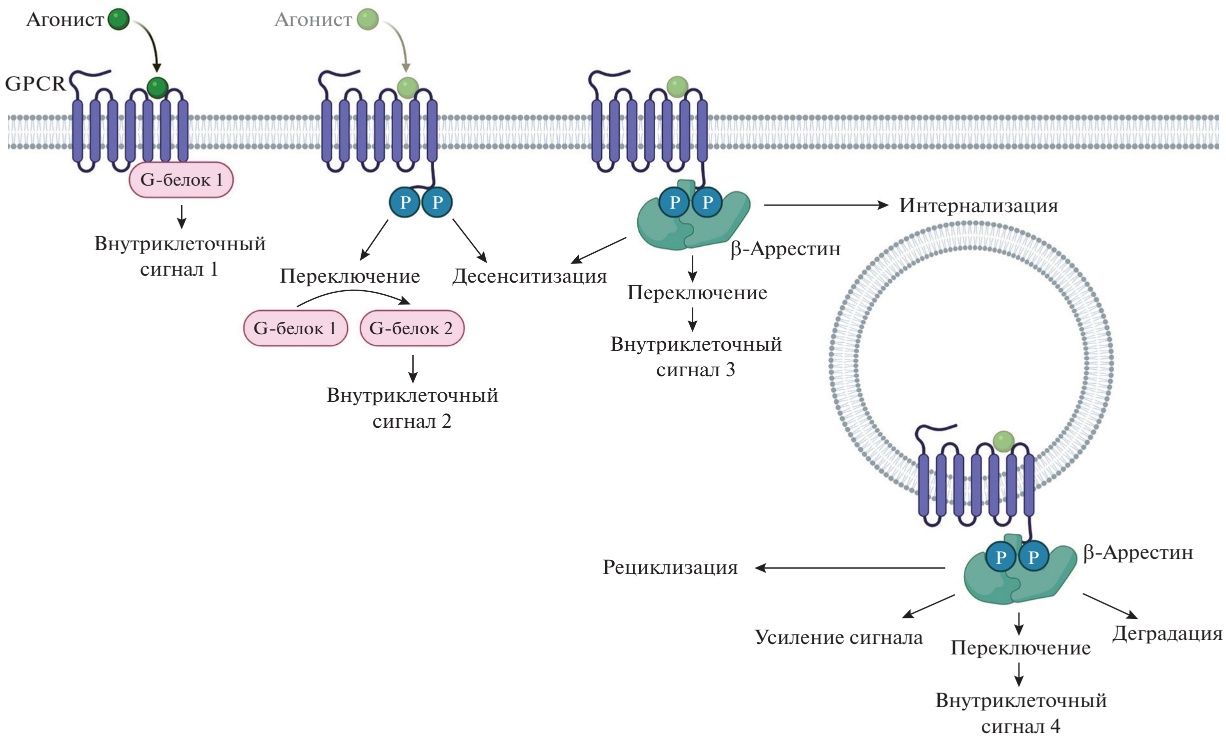

Рис. 1. Схематическое изображение ключевых механизмов регуляции функциональной активности семидоменных рецепторов. G-белок ассоциированный рецептор (GPCR) связывает агонист и запускает внутриклеточную сигнализацию посредством активации ассоциированного с ним G-белка (G-белок 1). При этом запускается внутриклеточный сигнал 1 типа. Фосфорилирование рецептора по его цитоплазматическому С-концу может приводить к нескольким различным последствиям. Во-первых, десенситизации рецептора – снижению или полному выключению передачи сигнала. Во-вторых, переключению активируемого рецептором G-белка и, соответственно, изменению активируемого сигнального каскада (Внутриклеточный сигнал 2). В-третьих, ассоциации с рецептором β-аррестина, который также может запускать сигнальные каскады (Внутриклеточный сигнал 3). β-Аррестин, в свою очередь, инициирует интернализацию рецептора. В составе эндосом рецептор может деградировать, рециклировать обратно на плазматическую мембрану; сигнал может усилиться или переключиться на Внутриклеточный сигнал 4.

муляция индивидуальных клеток норадреналином или агонистами адренорецепторов приводит к воспроизводимым кальциевым ответам на протяжении нескольких часов (Kotova et al., 2014).

Интернализация рецепторов не всегда приводит к десенситизации. Известны случаи, когда интернализация рецептора является необходимым условием для повышения его активности. Например, для рецептора паратиреоидного гормона показано, что интернализация гормон-рецепторного комплекса приводит к значительному усилению амплитуды и продолжительности продукции цАМФ (Ferrandon et al., 2009; Воронцова и др., 2021).

ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Способом регуляции гормональной чувствительности на молекулярном уровне является димеризация и олигомеризация семидоменных рецепторов – объединение нескольких рецепторов в комплекс для проведения сигнала. Димеризация впервые показана и лучше всего изучена для рецепторных тирозинкиназ, таких как рецептор эпидермального фактора роста EGFR или рецептор тромбоцитарного фактора роста PDGFR (Weiss, Schlessinger, 1998). Тем не менее, в настоящее время показано, что гомо- и гетеродимеризация является распространенным механизмом регуляции чувствительности и для семидоменных рецепторов. CXCR4 является классическим GPCR, связанным с Gi-белком, активация которого ингибирует аденилат-циклазу и продукцию цАМФ. CXCR4 в высокой степени склонен к гетеродимеризации. Так, α1-адренорецепторы, которые являются ключевыми медиаторами вазоконстрикторного действия симпатической нервной системы, гетеродимеризуется с CXCR4 на гладкомышечных клетках сосудов, что важно для осуществления их функций (Tripathi et al., 2015; Pozzobon et al., 2016). С каждым годом накапливается все больше сведений, указывающих на то, что многие GPCR располагаются в мембране в виде димеров. Например, GPCR класса C формируют постоянные гомо- и гетеродимеры (mGluR, GABAb). Олигомеризация рецепторов в настоящее время рассматривается, во-первых, как способ повышения вероятности проведения сигнала в клетку при связывании с лигандом. Во-вторых, как повышение чувствительности молекулы рецептора за счет увеличения числа сайтов связывания гормона. В-третьих, гетеро-олигомеризация может служить способом переключения сигнального каскада, который активирует рецептор.

В МСК гетеродимеризация рецепторов способна перенаправлять активируемые рецептором сигнальные каскады, регулируя функциональную активность клеток. Как было сказано выше, стимуляция ангиотензином II рецептора AT1R приводит к его быстрой интернализации (Sysoeva et al., 2017). Однако в популяции МСК при изучении кальциевых ответов на гормон на уровне одиночных клеток была обнаружена небольшая субпопуляция МСК, которая отвечает на добавление ангиотензина II повторяющимися кальциевыми ответами. Эти МСК отличаются от большинства клеток популяции, во-первых, экспрессией других изоформ рецепторов группы ангиотензина. Во-вторых, повышенной способностью вступать в адипогенную дифференцировку. Согласно нашей гипотезе, AT1R гетеродимеризуется с AT2R или другими рецепторами ангиотензина, что препятствует его интернализации. Кроме того, AT2R активирует PI3-киназный сигнальный каскад, усиливающий адипогенную дифференцировку этой малой субпопуляции МСК (Tyurin-Kuzmin et al., 2020a).

ДАУНРЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция гормональной чувствительности на уровне целой клетки включает в себя такие механизмы, при которых меняется чувствительность клетки как целого, даже при неизменности параметров отдельных молекул рецептора. В эту группу входят механизмы изменения количества рецепторов, представленных на поверхности клетки, изменение изоформного состава и ряд других. Даунрегуляция – это механизм десенситизации клеток, при котором происходит комплексное снижение представленности рецептора в клетке в целом. При этом происходит, во-первых, интернализация и последующая деградация рецептора в лизосомах. Во-вторых, снижается уровень мРНК рецептора. В отличие от десенситизации путем фосфорилирования и интернализации данный механизм приводит к долговременной десенситизации. Одним из первых изученных и наиболее известных примеров является даунрегуляция β2-адренергических рецепторов (Jockers et al., 1999; Qasim, McConnell, 2020). В МСК β-адренорецепторы также подвергаются даунрегуляции, но происходит это не во всех клетках. Изучение на уровне одиночных клеток изменения представленности β-адренорецепторов в МСК показало, что стимуляция норадреналином в течение 1 ч приводит к сокращению числа клеток, экспрессирующих β-адренорецепторы, но не изменяет уровень экспрессии рецепторов на оставшихся клетках. Например, среднее число клеток, экспрессирующих β2-адренорецепторы, сокращалось в 5 раз, а число клеток, экспрессирующих β1- и β3-адренорецепторы, уменьшалось слабее, от 1.5 до 5 раз в зависимости от донора (Tyurin-Kuzmin et al., 2016, 2018). При этом средняя представленность β-адренорецепторов на отдельных клетках, оцененная при помощи проточного цитометра по интенсивности флуоресценции клеток, меченных антителами к этим рецепторам, у большинства доноров не изменялась (Tyurin-Kuzmin et al., 2018). Таким образом, β-адренорецепторы в МСК демонстрируют два варианта ответа на избыточную стимуляцию гормоном – либо полная даунрегуляция рецептора, либо устойчивое сохранение представленности рецептора на поверхности клеток.

Выход рецепторов на поверхность клетки

Помимо снижения представленности рецепторов в клетках гормоны могут вызывать обратный процесс повышения числа молекул рецептора. В тех случаях, когда стимуляция одного рецептора приводит к увеличению экспрессии или выходу на поверхность других рецепторов, говорят о пермиссивном действии первого рецептора на второй. Наиболее широкоизвестный пример пермиссивного действия являют собой внутриклеточные рецепторы глюкокортикоидов, которые оказывают пермиссивное действие на адренорецепторы. Эстрогены повышают экспрессию β1- и β3-адренорецепторов на клетках эндотелия, что приводит к более выраженной вазодилатации при действии норадреналина. Более выраженная вазодилатация может обусловливать более низкие цифры артериального давления у женщин по сравнению с мужчинами (Riedel et al., 2019).

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СЕНСИТИЗАЦИЯ

Все описанные выше регуляторные процессы могут взаимодействовать друг с другом, формируя комплексный ответ на внешние воздействия. Это особенно хорошо видно на примере явления гетерологической сенситизации (ГС), описанного нами в МСК. ГС представляет собой уникальный феномен повышения чувствительности к действующему на клетку гормону с параллельным переключением активируемого пути внутриклеточной сигнализации в ответ на действие норадреналина. Мы обнаружили, что при продолжительном воздействии на МСК норадреналина, эти клетки, с одной стороны, снижают чувствительность к гормону через β-адренорецепторы, но, с другой, повышают чувствительность за счет существенного повышения экспрессии α1А-адренорецепторов (Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Как было сказано выше, в большинстве терминально дифференцированных клеток длительная активация β-адренорецепторов приводит к десенситизации клеток и, в некоторых случаях, к даунрегуляции. Однако в МСК при действии норадреналина происходит увеличение уровня α1A-адренорецепторов через 6 часов после действия гормона. Дополнительное количество молекул рецептора синтезируется и выходит на поверхность клеток, следствием чего является общее повышение чувствительности МСК к норадреналину более чем в 5 раз. Данный эффект опосредуется активацией β-адренорецепторов или добавлением активатора аденилат-циклазы форсколина. Сами β-адренорецепторы, запускающие этот механизм, подвергаются даунрегуляции (Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Таким образом, гетерологическая сенситизация МСК является комплексным механизмом регуляции гормональной чувствительности, при котором происходит одновременно даунрегуляция одних рецепторов, сенситизация других и, как следствие, переключение сигнализации, активируемой норадреналином в этих клетках.

ОБРАТИМАЯ ПОТЕРЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦЕЛОЙ КЛЕТКОЙ

Помимо уникального явления гетерологической сенситизации, на МСК был обнаружен еще один крайне интересный феномен регуляции чувствительности клеток к действующим гормонам. Мы изучали на уровне одиночных клеток чувствительность МСК к гормонам, активирующим цАМФ-зависимый сигнальный каскад гормонов (Tyurin-Kuzmin et al., 2020b), при помощи генетически-кодируемого биосенсора, который регистрирует активацию ПКА на уровне одиночных клеток (Zhang et al., 2018). Мы обнаружили, что на действующие гормоны способны отвечать только около 40% клеток популяции. Эти отвечающие клетки реагируют на различные гормоны без выраженной специфичности, одна и та же индивидуальная клетка формирует ответ на разные гормоны. Что интересно, вторая часть клеток популяции не отвечает ни на один из действующих гормонов (Tyurin-Kuzmin et al., 2020b). Добавление форсколина, активатора аденилат-циклаз, не приводит к существенному увеличению числа отвечающих клеток, а прямая активация ПКА при помощи проникающего в клетку аналога цАМФ, 6-Bnz-cAMP, активирует ответ биосенсора во всех клетках популяции. Эти результаты можно интерпретировать так: в клетках, не отвечающих на форсколин, не экспрессируются аденилат-циклазы, что мы и проверили при помощи анализа транскриптома одиночных клеток single-cell RNAseq. Действительно, по данным single-cell RNAseq, более чем в половине клеток популяции МСК не экспрессируется ни одной из десяти изоформ аденилат-циклаз. Кроме того, мы проверили, способны ли МСК изменять восприимчивость к действию гормонов путем регуляции экспрессии аденилатциклазы. Для этого мы получили колонии МСК из потомков одной клетки. Колонии были получены как из клеток, способных отвечать на действие гормона, так и не способных. Оказалось, что уже через две недели после пассирования клеток в полученных колониях вновь формируется гетерогенность по ответу на гормоны и форсколин – часть клеток популяции способна формировать ответ, часть – нет (Tyurin-Kuzmin et al., 2020b). Таким образом, МСК способны снижать чувствительность индивидуальных клеток к действию гормонов за счет обратимого подавления экспрессии ключевого участника сигнального каскада.

РЕГУЛЯЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗА СЧЕТ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ГОРМОН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК

К группе процессов, описываемых регуляцией гормональной чувствительности на тканевом уровне, относятся механизмы, для реализации которых необходимо взаимодействие между различными функциональными группами клеток в составе одной ткани. В организме стволовые клетки располагаются в клеточной нише. Этот термин описывает особое микроокружение, необходимое для поддержания жизнеспособности стволовой клетки, а также регуляции ее активности в зависимости от потребностей организма (Schofield, 1978; Raz, Yamashita, 2021). Подобная регуляция может осуществляться при помощи изменения чувствительности стволовой клетки к различным гормональным сигналам. В конечном счете это определяет выбор между поддержанием ее в состоянии покоя, запуском пролиферации, покиданием ниши, инициации дифференцировки и др. Тем не менее, чаще всего стволовая клетка в нише не обладает сигнальной и регуляторной автономностью и не способна самостоятельно реагировать на сигналы, приходящие из организма (Kulebyakin et al., 2020). Особенностью регуляции гормональной чувствительности клеток в нише является то, что она часто реализуется через процессы межклеточной передачи информации при участии особой субпопуляции клеток, называемой регуляторные клетки (рис. 2). Задачей этих клеток является восприятие системных организменных сигналов и их передача стволовым клеткам, расположенным в нише.

Этот принцип хорошо прослеживается при рассмотрении взаимодействия между нишей гемопоэтической стволовой клетки и симпатической нервной системой. Симпатическая сигнализация играет ключевую роль в мобилизации стволовых клеток из ниши, что реализуется через активацию β3-адренорецепторов. Однако нервные волокна не взаи-

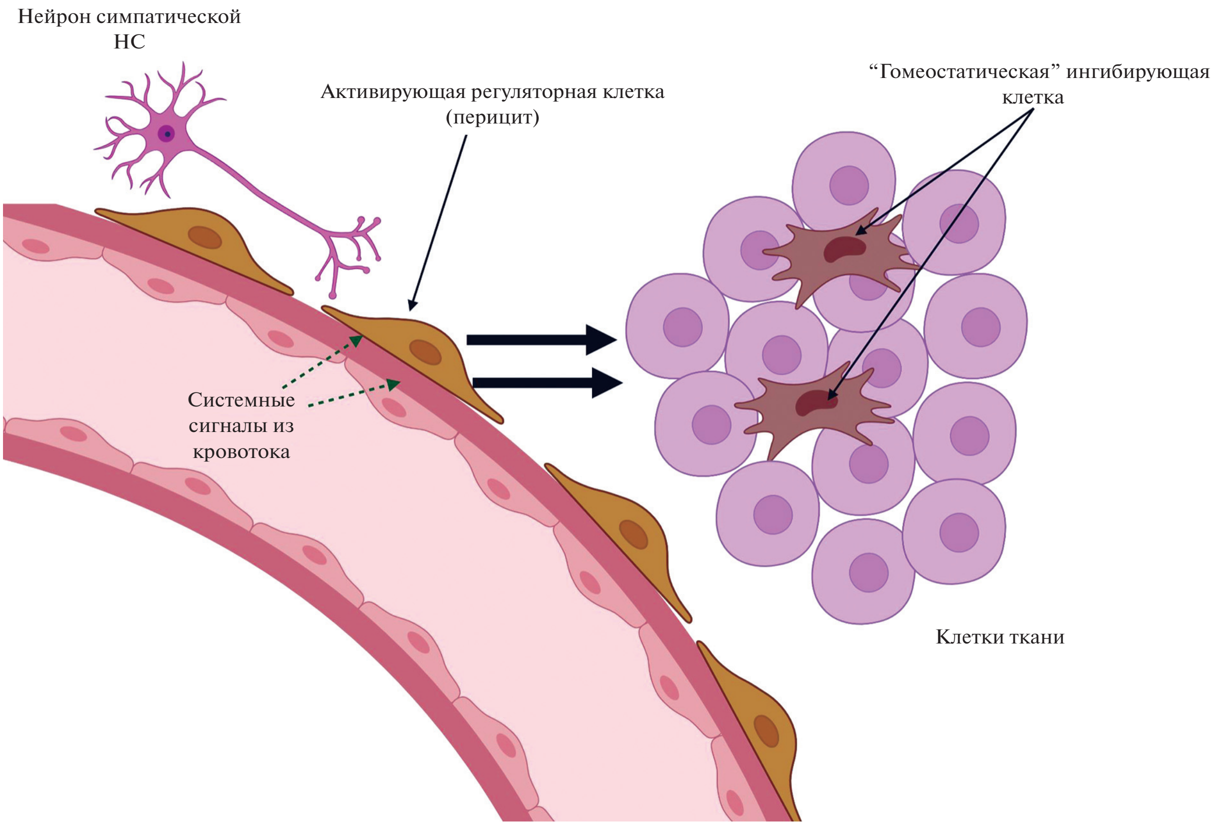

Рис. 2. Механизмы регуляции гормональной чувствительности клеток за счет специализированных клеточных субпопуляций. Системные гормональные сигналы из кровотока, а также сигналы симпатической нервной системы воспринимаются не всеми клетками ткани, а особой активирующей регуляторной клеткой, которая, в свою очередь, паракринно регулирует процессы, проходящие в ткани. Кроме того, в жировой ткани показано наличие "гомеостатической" ингибирующей популяции клеток.

модействуют напрямую с гематопоэтическими стволовыми клетками. В костном мозге симпатические нервные волокна ассоциированы с сосудами и с перицитами, с которыми они формируют щелевые контакты (Yamazaki, Allen, 1990), образуя нейро-ретикулярный комплекс. Таким образом, сигналы от симпатических нейронов передаются сначала на специализированные стромальные клетки, которые в свою очередь транслируют этот сигнал стволовым клеткам – регулируя их активацию и чувствительность к гормональным сигналам (Mendez-Ferrer et al., 2010).

РЕГУЛЯЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗА СЧЕТ "ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ" ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК

Для нормального функционирования ниши стволовой клетки недостаточно наличия только субпопуляций клеток, активирующих гормональную чувствительность стволовых клеток и стимулирующих процессы их мобилизации и дифференцировки. Важной задачей ниши является долговременное сохранение стволовой клетки в нативном состоянии, необходимом для сохранения регенеративного потенциала ткани. В составе ниши стволовой клетки могут присутствовать регуляторные популяции клеток, функцией которых является подавление гормональной чувствительности и сохранение недифференцированного состояния стволовых клеток (рис. 2).

Не так давно подобные клетки были описаны для депо стволовых клеток жировой ткани. В ее составе была охарактеризована малая субпопуляция клеток, несущая поверхностные маркеры CD142 и ABCG1. Эти клетки оказались способны снижать чувствительность МСК к проадипогенным гормональным стимулам и подавлять адипогенную дифференцировку (Schwalie et al., 2018, Ferrero et al., 2020). Поскольку в течение жизни рост жировой ткани может обеспечиваться либо за счет увеличения количества адипоцитов (гиперплазия), либо за счет увеличения объема адипоцитов (гипертрофия) (Muir et al., 2016), эта регуляторная субпопуляция может играть важную роль в определении способа роста жировой ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция гормональной чувствительности стволовых клеток взрослого организма крайне важна для их правильного участия в процессах репарации и регенерации тканей, поддержания гомеостаза и запуска дифференцировки. Большое разнообразие механизмов и форм регуляции обеспечивает гармоничное взаимодействие между организмом и стволовой клеткой, тонко подстраивая ее функционирование под динамически изменяющиеся потребности. При этом, помимо обычных для дифференцированных клеток механизмов, в стволовых клетках можно встретить уникальные формы регуляции чувствительности к гормонам. Например, феномен гетерологической сенситизации известен в процессе эмбрионального развития (Zeiders et al., 1999; Slotkin et al., 2003), но во взрослом организме встречается крайне редко. С другой стороны, стволовые клетки демонстрируют механизмы снижения или даже полной потери чувствительности к гормонам, что также очевидно диктуется особенностями их функционирования – необходимостью поддерживать некоторый пул стволовых клеток в недифференцированном состоянии в качестве регенеративного потенциала организма. Уникальность стволовых клеток с точки зрения механизмов регуляции особенно актуальна в свете развития нового направления биомедицинской науки – регенеративной медицины, стремящейся к лечению заболеваний за счет управления собственными регенеративными процессами в организме. Изучение особенностей регуляции гормональной чувствительности стволовых клеток находится еще только в самом начале развития, но не вызывает никаких сомнений, что именно в этой области предстоит обнаружить еще много нового, что может значительно изменить наше представление о том, как организованы клеточные системы передачи информации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов сердечно благодарит академика Всеволода Арсеньевича Ткачука за регулярное и крайне плодотворное осмысление результатов, обсуждаемых в этой статье. Иллюстрации выполнены в графическом редакторе BioRender.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РНФ № 21-15-00311 “Механизмы межклеточной коммуникации в поддержании гомеостаза и регуляции обновления жировой ткани”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Все авторы участвовали в обсуждении результатов и в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю., Маказан Н.В. и др. Паратиреоидный гормон в регуляции процессов роста и резорбции кости в норме и патологии // Вестник РАМН. 2021. Т. 76. № 5. С. 506–517.

Калинина Н., Сысоева В., Рубина К. и др. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 4. С. 32–39.

Терских В., Васильев А., Воротеляк Е. Ниши стволовых клеток // Известия российской академии наук. Серия биологическая. 2007. Т. 3. С. 261–272.

Ageeva L.V., Sysoeva V.Y., Tyurin-Kuzmin P.A. et al. Data supporting that adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells express angiotensin II receptors in situ and in vitro // Data Brief. 2018. V. 16. P. 327–333.

Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment // Cell. 2013. V. 154. № 2. P. 274–284.

Clevers H. What is an adult stem cell? // Science. 2015. V. 350. № 6266. P. 1319–1320.

Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A // Nature. 1997. V. 390. № 6655. P. 88–91.

Duncan A.W., Dorrell C., Grompe M. Stem cells and liver regeneration // Gastroenterology. 2009. V. 137. № 2. P. 466–481.

Ferrandon S., Feinstein T.N., Castro M. et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5. № 10. P. 734–742.

Ferrero R., Rainer P., Deplancke B. Toward a consensus view of mammalian adipocyte stem and progenitor cell heterogeneity // Trends Cell Biol. 2020. Dec. V. 30. № 12. P. 937–950.

Gurevich V.V., Gurevich E.V. GPCR signaling regulation: the role of GRKs and arrestins // Frontiers in Pharmacology. 2019. V. 10. P. 1–11.

Jockers R., Angers S., Da Silva A. et al. Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 41. P. 28900–28908.

Klein A.M., Nakagawa T., Ichikawa R. et al. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 2. P. 214–224.

Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A. et al. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 9. P. 1899–1908.

Kulebyakin K.Y., Nimiritsky P.P., Makarevich P.I. Growth factors in regeneration and regenerative medicine: "the cure and the cause" // Frontiers in Endocrinology. 2020. V. 11. № 384. P. 1–6.

Li L., Xie T. Stem cell niche: structure and function // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. V. 21 P. 605–631.

Lin F., Wang H.-Y., Malbon C.C. Gravin-mediated formation of signaling complexes in β2-adrenergic receptor desensitization and resensitization // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 25. P. 19025–19034.

Luttrell L.M., Roudabush F.L., Choy E.W. et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 5. P. 2449–2454.

Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche // Nature. 2010. V. 466. № 7308. P. 829–834.

Muir L.A., Neeley C.K., Meyer K.A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity // Obesity. 2016. V. 24. № 3. P. 597–605.

Nimiritsky P.P., Eremichev R.Y., Alexandrushkina N.A. et al. Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 4. Article 823.

Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis // Angiogenesis in Brain Tumors. 2004. V. 117. P. 3–32.

Pönicke K., Gröner F., Heinroth-Hoffmann I. et al. Agonist-specific activation of the β2-adrenoceptor/Gs-protein and β2-adrenoceptor/Gi-protein pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes // Br. J. Pharmacol. 2006. V. 147. № 7. P. 714–719.

Pozzobon T., Goldoni G., Viola A. et al. CXCR4 signaling in health and disease // Immunol. Lett. 2016. V. 177. P. 6–15.

Qasim H., McConnell B.K. AKAP12 Signaling complex: Impacts of compartmentalizing cAMP-dependent signaling pathways in the heart and various signaling systems // J. Am. Heart. Assoc. 2020. V. 9. № 13. Article e016615.

Raz A.A., Yamashita Y.M. Stem cell niche signaling goes both ways // Dev. Cell. 2021. V. 56. № 16. P. 2267–2268.

Riedel K., Deussen A.J., Tolkmitt J. et al. Estrogen determines sex differences in adrenergic vessel tone by regulation of endothelial β-adrenoceptor expression // American J. Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2019. V. 317. № 2. P. H243–H254.

Rockman H.A., Koch W.J., Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function // Nature. 2002. V. 415. № 6868. P. 206–212.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell // Blood Cells. 1978. V. 4. № 1–2. P. 7–25.

Schwalie P.C., Dong H., Zachara M. et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots // Nature. 2018. V. 559. № 7712. P. 103–108.

Shenoy S.K., Lefkowitz R.J. β-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction // Trends Pharmacol. Sci. 2011. V. 32. № 9. P. 521–533.

Slack J.M. What is a stem cell? // Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2018. V. 7. № 5. Article e323. P. 1–15.

Slotkin T.A., Auman J.T., Seidler F.J. Ontogenesis of beta-adrenoceptor signaling: implications for perinatal physiology and for fetal effects of tocolytic drugs // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 306. № 1. P. 1–7.

Song J., Zhong C., Bonaguidi M.A. et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision // Nature. 2012. V. 489. № 7414. P. 150–154.

Sysoeva V.Y., Ageeva L.V., Tyurin-Kuzmin P.A. et al. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem. Cell. Res. 2017. V. 25. P. 115–122.

Tripathi A., Vana P.G., Chavan T.S. et al. Heteromerization of chemokine (CXC motif) receptor 4 with α1A/B-adrenergic receptors controls α1-adrenergic receptor function // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112. № 13. P. E1659–E1668.

Tyurin-Kuzmin P.A., Dyikanov D.T., Fadeeva J.I. et al. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // Sci. Data. 2018. V. 5. Article 180196. P. 1–8.

Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Kanareikina M.A. et al. Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells // Sci. Rep. 2016. V. 6. Article 32835. P. 1–9.

Tyurin-Kuzmin P.A., Kalinina N.I., Kulebyakin K.Y. et al. Angiotensin receptor subtypes regulate adipose tissue renewal and remodelling // FEBS J. 2020a. V. 287. № 6. P. 1076–1087.

Tyurin-Kuzmin P.A., Karagyaur M.N., Kulebyakin K.Y. et al. Functional heterogeneity of protein kinase a activation in multipotent stromal cells // International J. Mol. Sci. 2020b. V. 21. № 12. Article 4442.

Weiss A., Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization // Cell. 1998. V. 94. № 3. P. 277–280.

Yamamoto R., Wilkinson A.C., Nakauchi H. Changing concepts in hematopoietic stem cells // Science. 2018. V. 362. № 6417. P. 895–896.

Yamazaki K., Allen T.D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: The "neuro-reticular complex" // American J. Anatomy. 1990. V. 187. № 3. P. 261–276.

Zang Y., Kahsai A.W., Pakharukova N. et al. The GPCR-β-arrestin complex allosterically activates C-Raf by binding its amino terminus // J. Biol. Chem. 2021. V. 297. № 6. Article 101369. P. 1–7.

Zeiders J.L., Seidler F.J., Slotkin T.A. Agonist-induced sensitization of beta-adrenoceptor signaling in neonatal rat heart: expression and catalytic activity of adenylyl cyclase // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999. V. 291. № 2. P. 503–510.

Zhang Q., Huang H., Zhang L. et al. Visualizing dynamics of cell signaling in vivo with a phase separation-based kinase reporter // Mol. Cell. 2018. V. 69. № 2. P. 334–346.

Specific Features of Regulation of Hormonal Sensitivity in Stem Cells

V. I. Chechekhin[1], K. Y. Kulebyakin[1], and P. A. Tyurin-Kuzmin[1, *]

[1]*Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com*

The normal functioning of an adult organism is based on the processes of maintaining homeostasis and the processes of reparation and regeneration. Many of these processes are regulated by the multipotent mesenchymal stromal cells (MSC), the specific group of postnatal stem cells. The functional activity of MSC is under tight neuro-endocrine regulatory control. Since most endocrine hormones and neuromediators act through G-protein associated receptors (seven-transmembrane domain receptors) in MSC, here we focused primarily on the regulation of this type of receptors. All the mechanisms discussed have been lined up in order from fairly simple and well-studied processes, such as receptor phosphorylation, to new and poorly studied mechanisms, such as regulation of the sensitivity of whole tissue, where hormonal sensor cells and effector cells can be described.

Keywords: mesenchymal stem cells, multipotent mesenchymal stromal cells, hormonal regulation, desensitization, internalization, heterodimerization, heterologous sensitization

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 173–195

ОБЗОРЫ

УДК 591.3

РЕЗИДЕНТНЫЕ НИШИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАЦИЯ: БЛЕСК И НИЩЕТА ВЗРОСЛОГО НЕЙРОГЕНЕЗА

© 2022 г. **В. П. Баклаушев[a, b, *], Г. М. Юсубалиева[a, b], Е. М. Самойлова[a, b], В. В. Белопасов[c]**

[a]*Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Ореховый бульвар 28, Москва, 115682 Россия*

[b]*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова 32, Москва, 119991 Россия*

[c]*Астраханский государственный медицинский университет, ул. Бакинская 121, Астрахань, 414000 Россия*

**e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru*

Поступила в редакцию 09.12.2021 г.
После доработки 28.01.2022 г.
Принята к публикации 05.02.2022 г.

Открытие нейрогенеза во взрослом состоянии, выделение и культивирование нейральных стволовых клеток (NSC) взрослого мозга и последующее получение из них аутологичных нейронов *in vitro* наполнили ученых надеждой на то, что вскоре будут созданы новые регенеративные технологии, позволяющие восстанавливать утраченные вследствие болезней и травм функции ЦНС. Однако в течение последующих тридцати лет ажиотаж и очарование новым открытием сменились осмыслением функций NSC и их критической оценкой. Новейшие данные по функционированию стволовых ниш во взрослом мозге и клональные исследования дериватов взрослых NSC позволяют заключить, что их функции во взрослом мозге скорее всего не связаны с репаративной регенерацией структур ЦНС. Молодые нейроны, образующиеся в субвентрикулярной и субгранулярной зонах взрослого мозга, встраиваясь в нейронные сети, выполняют вполне конкретные функции – модуляция распознавания запахов и функционирование обучения и памяти, соответственно. У высших приматов и человека нейрогенез в субвентрикулярной зоне не определяется, а уровень нейрогенеза в зубчатой извилине сопоставим с уровнем у мышей лишь в раннем постнатальном периоде, когда образующиеся молодые нейроны принимают участие в когнитивной пластичности, модулировании памяти и других функциях развивающегося гиппокампа. Наличие нейрогенеза у взрослого человека в новейших исследованиях не подтверждается. В условиях патологии в стволовых нишах взрослого мозга происходят глобальные изменения гомеостаза, сопровождающиеся активацией спящих NSC, усилением пролиферации выживших NSC и всех последующих клонов прогениторов, однако, в случае выраженной гибели клеток даже близлежащих структур мозга, эпиформной регенерации с участием вновь образованных нейробластов не происходит даже у низших млекопитающих. У человека, с учетом выраженной возрастной инволюции нейрогенеза в зубчатой извилине, восстановление церебральных функций осуществляется лишь посредством нейрональной пластичности. Понимание биологической роли взрослых NSC позволяет сделать вывод о том, что создание технологий клеточной регенерации заболеваний и травм ЦНС человека, если и возможно, то возможно только путем репрограммирования взрослых соматических клеток.

Ключевые слова: нейрогенез, нейральные стволовые клетки, ниши стволовых клеток, субвентрикулярная зона, субгранулярная зона, регенерация ЦНС

DOI: 10.31857/S0475145022030089

ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение нейральных стволовых клеток (NSC) взрослого мозга и доказательства нейрогенеза во взрослом состоянии породили новое научное направление – исследования совокупности клеточных субпопуляций и внеклеточного микроокружения, образующих ниши стволовых клеток взрослого мозга.

Интерес к этим исследованиям подогревался и подогревается прежде всего предположением о том, что понимание механизмов функционирования взрослых NSC откроет путь для создания новых регенеративных технологий восстановления функций ЦНС, утраченных вследствие заболеваний или травм. Обоснованием возможности создания таких технологий служили данные о возможностях регенерации ЦНС у более древних животных. Например, низшие позвоночные – рыбы и амфибии продолжают расти на всем протяжении жизни и сохраняют активные NSC во многих отделах ЦНС (Urbán et al., 2019). Эти животные во взрослом состоянии обладают способностью к регенерации структур нервной системы. Так, костистые рыбы, например, *Danio rerio* способны полностью восстановить поврежденную сетчатку глаза (Goldman, 2014) и структуры ЦНС после тяжелых повреждений, даже таких, как полный анатомический перерыв спинного мозга (Mokalled et al., 2016). При этом глиальный рубец, который у млекопитающих является патологическим блоком, препятствующим прорастанию регенерирующих нейронов, у *Danio rerio* не формируется. Наоборот, глиальные клетки в области очага травмы активируются экспрессирующимся там *ctgfa* и формируют мостик, по которому в область травмы прорастают регенерирующие аксоны (Mokalled et al., 2016).

"Чемпионом регенерации", безусловно, является ювенильная форма саламандры – мексиканский аксолотль, который может регенерировать *de novo* не только конечности, но и теленцефалон (Maden et al., 2013), глаз (Suetsugu-Maki et al., 2012) и анатомически прерванный спинной мозг (Demircan, 2020). В регенерации теленцефалона у аксолотля участвуют NSC субвентрикулярной зоны, мигрирующие в зону повреждения (Maden et al., 2013). При регенерации сетчатки у рыб и амфибий происходит очень интересный феномен – дифференцированные глиальные клетки Мюллера репрограммируются и подвергаются асимметричному делению, в результате которого образуются стволовые клетки, дающие начало нейронам сетчатки (Goldman, 2014). При регенерации удаленного фрагмента спинного мозга у аксолотля процесс регенерации начинается с массивного ремоделирования внеклеточного матрикса, путем преимущественной даун-регуляция экспрессии генов, обеспечивающих межклеточную адгезию, а также даун-регуляцией генов, связанных с воспалением и иммунным ответом, в частности сигнальных путей IL-17, TNF, NF-kappa B, а также рецепторов, обеспечивающих цитокин-цитокиновое взаимодействие (Demircan, 2020). Ремоделирование матрикса и локальная иммуносупрессия, судя по всему, приводят к репрограммированию клеток в зоне формирования бластемы и восстановлению структур спинного мозга – без участия резидентных стволовых клеток.

В процессе эволюции виды, начиная от низших млекопитающих, значительно утрачивают способность к клеточной регенерации ЦНС и у млекопитающих постнатальный пул стволовых клеток сохраняется лишь в небольших зонах вокруг боковых желудочков мозга и в области зубчатой извилины (*gyrus dentatus*, GD). При этом у грызунов наиболее интенсивный нейрогенез наблюдается в субвентрикулярной зоне, где образуется до 10000 нейробластов в сутки (Obernier, Alvarez-Buylla, 2019). У человека наличие взрослого нейрогенеза можно исследовать только постмортально, на момент смерти – по количеству клеток, экспрессирующих маркеры нейробластов, а на протяжении жизни – только с помощью радиоуглеродного анализа. Определение возраста ольфакторных нейронов по включению ^{14}C в их ДНК показало, что более 99% этих клеток имеют такой же возраст, как и сам исследуемый пациент на момент смерти, т.е. уровень нейрогенеза в субвентрикулярной зоне у взрослого человека совершенно незначителен, если вообще присутствует (Bergmann et al., 2012). Радиоизотопный анализ ^{14}C в ДНК нейронов GD позволил зарегистрировать нейрогенез и даже определить приблизительное количество новообразованных в течение жизни нейронов, которое для человека среднего возраста составило около 700 в сутки (Spalding et al., 2013). Согласно другим данным, основанным на иммуногистохимическом анализе, пролиферирующие прогениторные клетки в GD обнаруживаются лишь у детей в возрасте до 3 лет, при этом наиболее активен нейрогенез в первый год жизни, и затем интенсивность его резко падает, вплоть до исчезновения. Некоторое количество молодых нейронов было выявлено у детей от 7 до 13 лет, а у взрослых пациентов (18–77 лет), как у здоровых, так у больных эпилепсией юные нейроны в GD не обнаружены (Sorrells et al., 2018). Другая группа исследователей, наоборот, обнаружила большое количество молодых нейронов в гиппокампе у взрослых пациентов (Boldrini et al., 2018), однако более поздние исследования с помощью транскриптомного анализа не подтвердили наличие нейрогенеза в мозге у взрослого человека (Franjic et al., 2021). Взятые вместе эти данные ставят под сомнение наличие активного нейрогенеза в субгранулярной зоне (SGZ) GD гиппокампа у взрослых. Подтверждают рудиментарный характер нейрогенеза у приматов и исследование на макаках резусах, позволившее обнаружить пролиферацию нейрональных прогениторов в SGZ только в раннем постнатальном периоде (Sorrells et al., 2018).

Прогрессивное снижение уровня взрослого нейрогенеза от рыб и амфибий к грызунам и от грызунов к приматам и человеку, прямо коррелирующее со способностью к восстановлению ЦНС, говорит о возможной взаимосвязи взрослого нейрогенеза с регенеративным потенциалом нервной ткани. В этой связи, становится очевидным, что рудиментарный характер взрослого нейрогенеза у высших приматов и человека не может самостоятельно обеспечить регенерацию ЦНС. Спустя более чем 30 лет исследований взрослых NSC у лабораторных животных и человека, несмотря на существенные успехи в понимании организации стволовых ниш, регуляции покоя, пролиферации и дифференцировки NSC, регенеративные технологии восстановления ЦНС пока не созданы. Цель данного обзора – на основании современных представлений о биологии взрослых NSC обосновать точку зрения о том, почему функционирование ниш стволовых клеток взрослого мозга млекопитающих не может само по себе обеспечить эффективную регенерацию ЦНС.

ОНТОГЕНЕЗ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

NSC взрослого мозга – самообновляющийся пул покоящихся и/или пролиферирующих клеток, образующих непрерывный континуумом переходящих друг в друга форм, объединенных под общим термином "радиальная глия" и обеспечивающих нейрогенез в SGZ и вентрикулярно-субвентрикулярной (V-SVZ) зонах головного мозга на протяжении всей жизни млекопитающих, включая человека (Gross, 2000). В последние десятилетия нейрогенез обнаружен и в других отделах головного мозга, в частности в гипоталамусе, ядрах нигростриарной системы, амигдале и некоторых отделах коры, однако, доказательств того, что там существуют свои резидентные NSC, а не NSC, мигрирующие из V-SVZ и SGZ пока недостаточно (для обзора см. – Li et al., 2018; Obernier, Alvarez-Buylla, 2019; Jurkowski et al., 2020). Тремя основными характеристиками NSC взрослого мозга является возможность длительного пребывания в состоянии пролиферативного покоя, способность к самоподдержанию пула стволовых клеток на протяжении всей жизни, а также способность генерировать популяции промежуточных прогениторов, из которых затем образуются молодые нейроны и глиальные клетки.

Первооткрывателем нейрогенеза во взрослом мозге можно считать Joseph Altman, который еще в 1962-м году на основании данных радиоизотопных исследований предположил, что в гиппокампе и обонятельной луковице головного мозга млекопитающих во взрослом состоянии образуются новые нейроны (Altman, 1962). Лишь два десятилетия спустя Gail D. Burd и Fernando Nottebohm в исследованиях на канарейках доказали, что вновь образованные в ядре, контролирующем пение, клетки формируют синапсы и генерируют нейрональную электрофизиологическую активность, т.е. действительно являются возникшими *de novo* нейронами (Burd et al., 1985). Окончательные доказательства существования взрослых NSC были получены Brent Reynolds и Samuel Weiss в начале 90-х гг. прошлого века, когда их удалось выделить из стриатума взрослой мыши и в экспериментах *in vitro* вырастить EGF-индуцированные нейросферы и продемонстрировать их способность к дифференцировке в нейрональном и астроглиальном направлении (Reynolds et al., 1992).

ПРОИСХОЖДЕНИЕ NSC

Взрослые NSC или клетки радиальной глии из V-SVZ и SGZ взрослого мозга имеют много общих черт как с дифференцированными астроцитами – экспрессия нестина и GFAP, так и с пренатальными клетками радиальной глии – экспрессия CD133, Sox2, BLBP, GLAST и др., а также апико-базальная эпителиальная структура (рис. 1) (Fuentealba et al., 2015). Исследования с применением секвенирования РНК в режиме single-cell показали, что взрослые NSC происходят из эмбриональных радиальных предшественников (радиальная глия), которые, в свою очередь являются потомками нейроэпителиальных стволовых клеток (Yuzwa et al., 2017). Эмбриональные радиальные предшественники впервые появляются в мозге у мышей в срок E11.5, а в период с E13.5 до E15.5 формирование их популяции заканчивается (Fuentealba et al., 2015). К концу пренатального периода часть этих клеток переходят в покоящееся состояние, в котором могут пребывать довольно долго, вплоть до активации нейрогенеза в V-SVZ и SGZ в постнатальном периоде (Obernier et al., 2019). Эти клетки (которые в переднем мозге еще называют пре-B1) экспрессируют негативный регулятор клеточного цикла $p57^{kip2}$ (Cdkn1c) (Fuentealba et al., 2015). Профиль транскрипции этих покоящихся GFAP-позитивных клеток соответствует транскриптому покоящихся взрослых NSC (qNSC, от англ. quiescence Neural Stem Cells), что позволяет предполагать, что это одна и та же субпопуляция NSC (Yuzwa et al., 2017). В постнатальном периоде qNSC активируются и, вероятно, проходят несколько промежуточных делений, прежде чем в V-SVZ превратиться в клетки B1, или в их аналоги в SGZ – клеткам радиальной глии (РГ) первого типа, которые формируют нишу стволовых клеток взрослого мозга.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ NSC ВЗРОСЛОГО МОЗГА

NSC взрослого мозга происходят из клеток эмбриональной радиальной глии, которые в раннем эмбриональном периоде генерируют все разнообразие нейронов переднего мозга. NSC проявляют гетерогенность в зависимости от локализации в ростро-каудальном и дорсо-вентральном направлениях, что, вероятно, обусловлено конкретными подтипами родительской радиальной глии (Chaker et al., 2016; Obernier et al., 2019). Клональный трекинг подтвердил, что NSC из различных отделов ниши V-SVZ производят различные типы ольфакторных нейронов (Merkle et al., 2014). В ростральных отделах V-SVZ генерируются кальретинин позитивные (CalR+) гранулярные нейроны (granule cells, GCs) и CalR+ перигломерулярные нейроны. Там же, но вентрально производится несколько подтипов интернейронов. В латеральных отделах V-SVZ на всем протяжении в

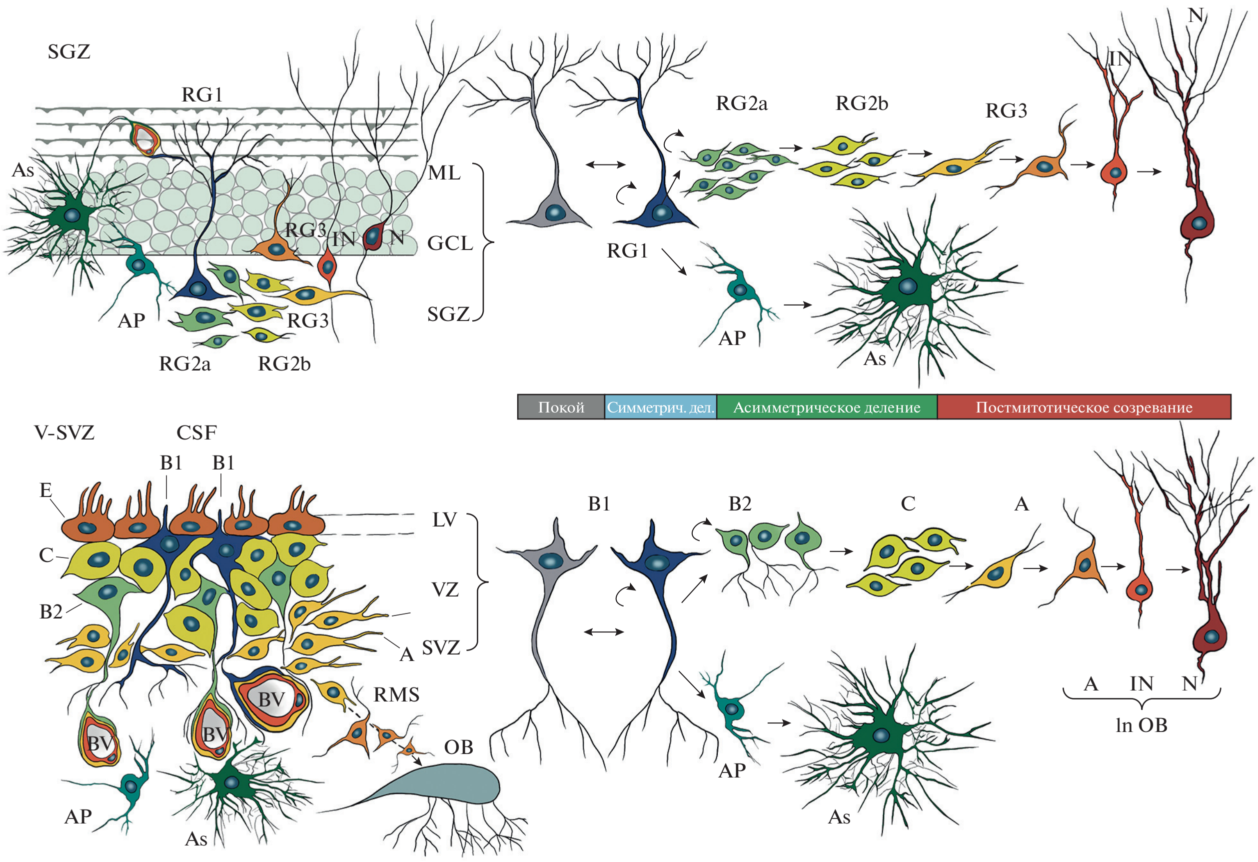

Рис. 1. Схематическая структура организации ниш стволовых клеток в головном мозге. Взрослые нейральные стволовые клетки (NSC) располагаются в двух нишах головного мозга – субгранулярной зоне зубчатой извилины (SGZ) и желудочково-субвентрикулярной зоне (V-SVZ). NSC (клетки B1) в V-SVZ напрямую контактируют ресничкой с цереброспинальной жидкостью (CSF) через стенку боковых желудочков (LV). Клетки B2 располагаются более базально и получают внешние сигналы только от микрососудов (BV). Нейробласты и молодые нейроны V-SVZ (клетки A), образуясь из промежуточных прогениторов (C), мигрируют по ростральному миграционному пути (RMS) в обонятельную луковицу (OB), где происходит их постмитотическое созревание. В SGZ NSC (клетки RG1) получают системные сигналы только через кровеносные сосуды (BV). Весь путь от NSC, через промежуточные прогениторы, имеющие глиальный (RG2a) и пронейрональный (RG2b) фенотип до нейробласта (RG3), молодого нейрона (IN) и постмитотического нейрона (N) проходит в пределах ниши. В процессе постмитотического созревания клетки RG3 из SGZ перемещаются в слой гранулярных клеток GCL и выпускают отростки в молекулярный слой (ML) и затем, в процессе постмитотического созревания — в CA3 и CA2 зоны гиппокампа. В V-SVZ и SGZ также всегда присутствуют астроцитарные прогениторы (Ap) и астроциты (As).

рострокаудальном направлении генерируются гранулярные клетки глубоких слоев. В каудальных отделах V-SVZ вентрально расположенные NSC производят кальбиндин-позитивные (CalB+) перигломерулярные нейроны, а дорсолатеральные NSC генерируют дофаминергические (TH+) нейроны и поверхностные гранулярные нейроны (Fuentealba et al., 2015; Chaker et al., 2016; Obernier et al., 2019). Важно отметить, что эта гетерогенность NSC обусловлена их клональными особенностями, а не сигналами локального микроокружения – пересадка NSC в другие зоны V-SVZ не меняет фенотипа генерируемых ими нейронов (Merkle et al., 2007).

Генетический трекинг клонов стволовых клеток с помощью Cre-рекомбиназы (CreERT) позволил обнаружить функциональную гетерогенность NSC в V-SVZ и SGZ. Некоторые клоны NSC в SGZ оказались активно пролиферирующими и коротко живущими, другие наоборот – длительно сохраняют мультипотентность, периодически уходя в состояние покоя, и обновляют свою популяцию в течение долгого времени (Ibrayeva et al., 2021). Если первый тип – короткоживущие клоны NSC однажды активировавшись, никогда не возвращаются в состояние покоя, то вторые – длительно существующие NSC, судя по всему, способны неоднократно переключаться между покоем и пролиферацией (Urbán et al., 2019).

ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ В НИШАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО МОЗГА

В механизмах регуляции покоя/пролиферации/дифференцировки NSC в стволовых нишах можно выделить внешние сигналы (факторы из кровотока и цереброспинальной жидкости (CSF), импульсы внешних ГАМК-, серотонин-, дофаминергических и др. нейронов и внутренние/локальные сигналы – продукция белков внеклеточного матрикса, локальная экспрессия факторов роста и др. локальный сигналинг в нише стволовых клеток (Kjell et al., 2020).

Несомненную роль в активности нейрогенеза играют интегральные физиологические факторы, такие как общая физическая и когнитивная активности, стресс, голод, поисковое поведение, тренировка и пр. Однако исследование таких интегральных факторов сопряжено с методическими трудностями, так как их реализация осуществляется через конкретные системные и локальные механизмы (Urbán et al., 2019). Например, показано, что произвольная физическая активность, в частности, регулярные занятие бегом, активирует нейрогенез в субгранулярной зоне. Этот эффект, судя по всему, является результирующим ответом на мультимодальные изменения, обусловленные как внешними факторами (изменения перфузии/оксигенации, метаболические изменения, модуляция активности гипоталамических нейронов и пр.), так внутренними факторами, включающими повышения уровня IGF1, VEGF (Kjell et al., 2020), а также ряда нейротрансмиттеров, в частности – серотонина в гипокампе в ответ на физическую активность (Han et al., 2015).

Системные сигналы, регулирующие нейрогенез подвержены влияниям возраста, пола, метаболического статуса, циркадных ритмов и пр. факторов, которые невозможно полностью учесть и стандартизовать при различных исследованиях. Физиологический статус может влиять на нейрогенез опосредованно через активность гипоталамических нейронов, иннервирующих ниши стволовых клеток. В частности, чувство голода/насыщения соответственно стимулирует или угнетает активность proopiomelanocortin-позитивных нейронов, которые селективно иннервируют V-SVZ и активируют пролиферацию определенных субпопуляций NSC (Klempin et al., 2013).

Следует понимать, что все опубликованные исследования по регуляции ниш стволовых клеток изучают отдельные сигналы (ГАМКергическая стимуляция, ACSL1, Notch, BMP, Wnt, EGF, LRIG1 и др.). В реальности же происходит одновременный мультимодальный сигналинг, причем как синергических, так и антагонистических сигналов и каждая конкретная клетка, вероятно, реализует некий результирующий регуляторный импульс (Urbán et al., 2019). О синергизме/антагонизме различных сигнальных каскадов известно много, но далеко не все. Так сигналы EGF и PEDF (pigmented epithelium-derived factor) синергичны пути Notch и WNT в активации пролиферации NSCs в V-SVZ (Paul et al., 2017). Синергическую активность Notch и WNT даже остроумно назвали “WNTCH” (Aguirre et al., 2010). Практически все локальные сигналы в нишах стволовых клеток имеют отношение либо к активации пролиферации NSC, либо к аресту клеточного цикла и переходу в состояние покоя (табл. 1), поэтому подробнее будут рассмотрены в следующем разделе.

СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ NSC – КЛЮЧЕВАЯ ТОЧКА РЕГУЛЯЦИИ ВЗРОСЛОГО НЕЙРОГЕНЕЗА

Состояние покоя – одно из важнейших свойств взрослых резидентных NSC, обеспечивающее сохранность “наивного” пула NSC на протяжении всей жизни. Доля qNSC в нишах стволовых клеток взрослого мозга довольно высока на всем протяжении онтогенеза; есть данные о том, что большинство взрослых NSC бóльшую часть времени находятся в состоянии обратимого ареста клеточного цикла в фазе G0 или G2 (Otsuki et al., 2018). В этой связи, одной из ключевых точек регуляции взрослого нейрогенеза является выход qNSC из состояния покоя, который обеспечивается различными сигналами микроокружения ниши стволовых клеток (для обзора см. Urbán et al., 2019) (табл. 1). Состояние покоя сопровождается пониженной метаболической активностью и уменьшением синтеза РНК и белка. Вместе с тем, последние исследования показали, что состояние покоя – динамически регулируемый процесс, включающий генетическую программу, предотвращающую дифференцировку и обеспечивающую обратимость ареста клеточного цикла (Codega et al., 2014; Otsuki et al., 2018; Basak et al., 2018; Ibrayeva et al., 2021).

qNSC в V-SVZ и SGZ экспрессируют GFAP и CD133/проминин и идентифицируются по отсутствию маркеров пролиферации (Ki67, MCM2); активированные NSC сохраняют GFAP и становятся EGFR позитивными, т.е. главным митогеном, запускающим пролиферацию NSC, является EGF (Pastrana et al., 2009). Эти клетки, вступая в клеточный цикл, генерируют быстро пролиферирующие промежуточные прогениторы или транзиторно амплифицирующиеся прогениторы (TAPs, transit-amplifying progenitors) – C клетки в V-SVZ или клетки 3 типа в SGZ. Они теряют GFAP и маркеры стволовости и могут быть идентифицированы по включению BrdU/EdU, экспрессии Ki67 и MCM2, а также по высокому уровню экспрессии EGFR (Codega et al., 2014; Marqués-Torrejón et al., 2021) (табл. 2). Сравнения

Таблица 1. Факторы, регулирующие переход NSCs в состояние покоя

Активация NSC (вывод из покоящегося состояния)	Перевод в покоящееся состояние/арест клеточного цикла
Внутренние сигналы ниши	
LRIG1 (Marqués-Torrejón et al., 2021)	Itgb1 (интегрин b1) (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008)
FGFR3 (Basak et al., 2018)	MFGE8 (Brooker et al., 2016; Zhou et al., 2018)
FGF 2 (Douet et al., 2012; Douet et al., 2013; Mercier et al., 2014)	PTEN (Brooker et al., 2016; Zhou et al., 2018)
EGFR (Artegiani et al., 2017)	ID2, 3, 4 (Bai et al., 2007; Brooker et al., 2016; Zhou et al., 2018)
PEDF (Andreu-Agulló et al., 2009)	Aqp4 (Marqués-Torrejón et al., 2021)
ACSL1 (Urbán et al., 2016; Pilz et al., 2018)	E3 убиквитин лигаза HUWE1 (Urbán et al., 2016)
Sox2 (Baser et al., 2019)	ApoE3 (Marqués-Torrejón et al., 2021)
Pax6 (Baser et al., 2019)	Aldoc (Marqués-Torrejón et al., 2021)
Notch1-сигналинг (Delta1 или Jagged1) (Ottone et al., 2014)	Notch2 и Notch3-сигналинг (Basak et al., 2012; Kawai et al., 2017; Zhang et al., 2019)
RBPJK (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019)	Sox9 (Llorens-Bobadilla et al., 2015)
DII1, 3 (Llorens-Bobadilla et al., 2015)	Hes1, 5 (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019)
WNT (Lie et al., 2005; Bowman et al., 2013)	FoxO3 (Schaffner et al., 2018)
Noggin (Lim et al., 2000) (ингибирует BMP)	BMP1, 6, 4/7 (Llorens-Bobadilla et al., 2015; Basak et al., 2018; Marqués-Torrejón et al., 2021)
SHH (Zappaterra et al., 2012)	REST (Mukherjee et al., 2016)
CD9 (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019)	NT-3 (Delgado et al., 2014)
TLX (Zhao et al., 2009)	EFNB2 (EPHRIN B2) (Ottone et al., 2014)
CDK4 (Chirivella et al., 2017)	SFRP3 (Jang et al., 2013; Seib et al., 2013)
Циклин D1 (Ccnd1) (Artegiani et al., 2011)	DKK1 (Jang et al., 2013; Seib et al., 2013)
AKT-mTOR1-сигналинг (Bonaguidi et al., 2011)	p27 (Andreu et al., 2015)
BMP5 (Silva-Vargas et al., 2016)	p57 (Furutachi et al., 2013)
IGF (Lehtinen et al., 2011; Silva-Vargas et al., 2016)	p21 (Marqués-Torrejón et al., 2013)
LIF (Bauer et al., 2006)	IL1 beta (Kokovay et al., 2010)
GDF11/BMP11 (Katsimpardi et al., 2014)	Сфингозин-1-фосфат (Sato et al., 2007; Kondabolu et al., 2011; Codega et al., 2014)
Бетацеллюлин (BTC) (Gómez-Gaviro et al., 2012)	Постагландин D2 (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019)
Mki67 (Llorens-Bobadilla et al., 2015)	Интегрин-связанная киназа (Ilk) (Porcheri et al., 2014)
Myc (Leeman et al., 2018)	BMPR1b (Llorens-Bobadilla et al., 2015)
Внешние сигналы (нейротрансмиттеры и гормоны)	
Diazepam binding inhibitor (DBI) (подавляет ответ на ГАМК) (Alfonso et al., 2012)	ГАМК (Song et al., 2012)
Дофамин (Baker et al., 2004; Höglinger et al., 2004; Lennington et al., 2011)	Дофамин (Kippin et al., 2005)
Каиновая кислота (агонист глутаматных рецепторов) (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019)	
Серотонин (Tong et al., 2014a)	
Глутамат (Song et al., 2017)	
Ацетилхолин (Paez-Gonzalez et al., 2014)	
Проприомеланокортин (POMC) (Paul et al., 2017)	
Пролактин (Shingo et al., 2003)	Системные глюкокортикоиды (Anacker et al., 2017)

транскриптома qNSC и пролиферирующих прогениторов выявило отличия, затрагивающие не только гены, ассоциированные с разными фазами клеточного цикла. У пролиферирующих NSC активно экспрессируются гены, связанные с транскрипцией, трансляцией и репарацией ДНК, в то время как у qNSC в транскриптоме превалируют гены, продукты которых вовлечены в межклеточный сигналинг, клеточную адгезию и функционирование межклеточного матрикса (Codega et al., 2014; Basak et al., 2018; Urbán et al., 2019). Эти данные свидетельствуют о том, что состояние пролиферативного покоя для NSC не является неким анабиозом, но характеризуется активным участием в межклеточном взаимодействии в пределах стволовой ниши.

Выше мы уже упоминали, что одним из интегральных регуляторов нейрогенеза является межклеточный матрикс. Большое значение белки внеклеточного матрикса имеют и в регуляции пролиферативной активности NSC. В частности, сигналы, передающиеся через интегриновый рецептор b1 способствуют переходу NSC в состояние покоя (табл. 1). С другой стороны, qNSC являются основными продуцентами белков внеклеточного матрикса (ECM) и регуляторами его ремоделирования, которое, в частности, осуществляется посредством экспрессии qNSC мультифункционального фермента трансглутаминазы 2, также участвующего в регуляции нейрогенеза (Kjell et al., 2020). Эта активность qNSC и активируемых ими локальных клеток, обеспечивает существенные отличия ECM в нишах стволовых клеток мозга по сравнению с другими структурами мозга.

Переход из состояния покоя в пролиферирующее состояние сопровождается перестройкой метаболизма клетки, в частности переключением с гликолиза на окислительное фосфорилирование в качестве основного источника энергии, активацией экспрессии рибосомальных генов, генов клеточного цикла, транскрипционных факторов, увеличением синтеза РНК (Merkle et al., 2014; Basak et al., 2018). Здесь следует отметить, что в поддержании состояния покоя NSC важную роль играет транскрипционный репрессор REST (RE1-Silencing Transcription factor), напрямую подавляющий экспрессию рибосомальных генов, генов клеточного цикла и нейрональной дифференцировки (Mukherjee et al., 2016). Нокаут гена REST приводит к преждевременной активации qNSC и последующему истощению нейрогенеза. Экспрессия гена REST в NSC препятствует их переходу в пролиферирующее состояние. Наоборот, оверэкспрессия мишеней REST, необходимых для биогенеза рибосом и активации клеточного цикла выводит клетку из состояния покоя (Mukherjee et al., 2016).

Важную роль в поддержании состояния покоя NSC так же, как и в активации нейрональной дифференцировки, играет регуляция трансляции факторов поддержания мультипотентности и пронейрональной дифференцировки. Так, в покоящихся qNSC инактивирован транскрипционный фактор нейрональной дифференцировки ASCL1 (achaete-scute family bHLH transcription factor 1) с помощью посттрансляционных механизмов с участием E3 убиквитин лигазы HUWE1 и репрессорного белка ID4 (Urbán et al., 2016). Репрессия посттрансляционной активации ASCL1 возвращает NSC в покоящееся состояние, а ее включение, наоборот, способствует пролиферации и нейрональной дифференцировке. Трансляция транскриптов двух других важнейших в судьбе NSC генов – *SOX2* и *PAX6* также репрессирована в покоящемся состоянии и дерепрессируется при активации пролиферации и дифференцировки (Baser et al., 2019). Таким образом, посттранскрипционная модификация ключевых факторов нейрогенеза является еще одной важной петлей регуляции, участвующей в поддержании динамического равновесия между покоем и пролиферацией NSC.

Отслеживание судьбы клонов NSC, экспрессирующих *Ascl1* в SGZ взрослого мозга показало, что они проходят некое ограниченное количество симметричных и ассиметричных делений, вызывая всплеск нейрогенеза, после которого исчезают, вероятно, претерпевая глиальную дифференцировку (Pilz et al., 2018). Это напоминает процессы, проходящие при эмбриональном развитии головного мозга, когда активно пролиферирующие прогениторы прогрессивно теряют свою способность к самообновлению и полностью уходят в дифференцировку (Urbán et al., 2019). Выключение гена *Ascl1* останавливает процесс истощения пула NSC. Наоборот, выключение поддерживающих состояние покоя генов, таких как *Itgb1* (*integrin* β*1*), *Pten*, или *Mfge8*, так же, как введение агониста рецепторов глутамата – каиновой кислоты или инактивация E3 убиквитин лигазы HUWE1, приводящая к активации ASCL1, ускоряет истощение пула NSC и их астроцитарную дифференцировку (Brooker et al., 2016; Zhou et al., 2018). Таким образом, ASCL1, является одним из основных активаторов нейрогенеза в SGZ, в результате действия которого NSC, вероятно, уже не возвращаются в состояние покоя, а полностью используют свой нейрогенный потенциал.

КЛЕТОЧНЫЙ КОНТИНУУМ В НИШАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО МОЗГА

Транскриптомный анализ отдельных клеток позволил сделать заключение о том, что в стволовых нишах взрослого мозга существует почти непрерывный континуум переходных состояний NSC – от глубокого покоя до активной пролиферации (Llorens-Bobadilla et al., 2015; Urbán et al., 2019; Marqués-Torrejón et al., 2021). Глубина покоя qNSC характеризуется, в частности, более высоким уровнем экспрессии *ApoE3* (*ApoE*), *Aldoc*, или *Id1*–*Id3* в более глубоко покоящихся клетках. Регуляция покоя/активности NSC осуществляется тремя основными сигнальными путями: BMP, FGF и EGF. Активация сигнального пути BMP-4 опосредованно через экспрессию негативного эффектора *Id1*, запускает выход NSC из клеточного цикла и образование популяции "спящих" d-qNSC (от англ. dormant non-cycling quiescent state, d-qNSCs) (Marqués-Torrejón et al., 2021). При уменьшении "глубины покоя" и переходе в пролиферирующую стадию в qNSC постепенно нарастает экспрессия генов сигнального пути FGF, в частности, *Fgfr3* (Basak et al., 2018) и пути EGF (Artegiani et al., 2017). Комбинированный сигналинг BMP-4/FGF-2 индуцирует образование особой субпопуляции qNSC, готовой для входа в клеточный цикл, названной "праймированные покоящиеся клетки" или p-qNSC (от англ. primed quiescent neural stem cells) (Basak et al., 2018; Marqués-Torrejón et al., 2021).

Новейшие исследования показали, что наиболее важная для возвращения в клеточный цикл субпопуляция p-qNSC характеризуется высоким уровнем экспрессии негативного регулятора RTK сигналинга LRIG1 и CD9. Для субпопуляции p-qNSC было показано, что меченные геном eGFP эти клетки могут быть успешно трансплантированы в субвенрикулярную зону сингенным мышам, где они активно включаются в нейрогенез (Marqués-Torrejón et al., 2021).

Выключение гена *Lrig1* в пределах SVZ *in vivo* приводит к увеличению уровня пролиферации NSC в этой нише. Таким образом, LRIG1 является важнейшим регулятором выхода p-qNSC из состояния покоя, "привратником", от которого зависит чувствительность клетки к сигналам EGFR и возвращение в пролиферирующее состояние.

СПОСОБЫ ДЕЛЕНИЯ NSC – СИММЕТРИЧНОЕ И АСИММЕТРИЧНОЕ

Выходя из состояния покоя, NSC могут вступить в ассиметричное деление, при котором образуется стволовая клетка и нейрональная прогениторная клетка либо астроцит или в симметричное деление, в результате которого могут образоваться две стволовых клетки (дупликативное или амплифицирующее деление) или две дифференцированных клетки (дифференцировочное деление) (Pilz et al., 2018). Клональный трекинг NSC с помощью ретровирусной трансдукции репортерных генов показал, что в SGZ зубчатой извилины преимущественно наблюдается асимметричное деление, в то время как в V-SVZ превалирует симметричное деление (Basak et al., 2018; Obernier et al., 2019). При этом, в большинстве случаев происходит дифференцировочное симметричное деление и лишь небольшая часть NSC в V-SVZ (20–30%) подвергаются дупликативному делению, восполняя пул стволовых клеток (Obernier et al., 2019). Таким образом, симметричное деление позволяет независимо регулировать два процесса – самоподдержание популяции NSC, а также дифференцировку и создание пула молодых нейронов.

Выбор режима деления определяется сигналами стволовой ниши, в частности ГАМКергической импульсацией. Выключение тонических ГАМКергических сигналов в зубчатой извилине путем делеции gamma2 субъединицы GABAA рецептора сопровождается преждевременным выходом NSC из состояния покоя и увеличением доли симметричного деления (Urbán et al., 2019).

СТРУКТУРА НИШ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Ниши стволовых клеток взрослого мозга – V-SVZ и SGZ организованы похоже и состоят из собственно стволовых клеток (покоящихся и/или пролиферирующих), имеющих фенотип радиальной глии (GFAP+, Nestin+) и признаки стволовости (Sox2+, CD133+), нескольких многочисленных субпопуляций промежуточных прогениторных клеток (обозначаемых в разных источниках TAP или IPC), которые в процессе деления постепенно теряют мультипотентность и последовательно становятся нейральными прогениторами, нейробластами и молодыми нейронами, или глиальными прогениторами и астроцитами (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019) (табл. 2).

Несмотря на общие принципы организации, ниши стволовых клеток в V-SVZ и SGZ имеют и принципиальные различия. В V-SVZ нейробласты и молодые нейроны покидают нишу, мигрируя в обонятельную луковицу, в то время как в SGZ молодые нейроны располагаются в непосредственной близости от ниши – занимая свое место в слоях гранулярных нейронов зубчатой извилины. Это отличие позволяет предполагать различный уровень пронейрональных локальных факторов. Кроме того, принципиальным отличием V-SVZ является непосредственный контакт NSC с эпендимой и через нее – с CSF, что обеспечивает ответы V-SVZ на изменения в ликворной системе и секреторной активности хориоидного сплетения (Urbán et al., 2019; Obernier et al., 2019).

V-SVZ

Расположенная перивентрикулярно и субэпендимально вокруг боковых желудочков зона V-SVZ содержит большое количество NSC, называемых клетками радиальной глии типа B1, которые морфологически и иммунофенотипиче-

Таблица 2. Характеристика основных клеточных субпопуляций в церебральных нишах стволовых клеток

Тип клеток	Название		Маркеры	Функции
	V-SVZ	SGZ		
Покоящиеся NSC	qNSC	qNSC	Nestin, GFAP, CD133, Vimentin, Itgb1, Pten, Mfge8, Aqp4, Id3, Aldoc, ApoE3, FoxO3, Hes1, Spot14, Ilk	Сохранение пула NSC на протяжении жизни
Пролиферирующие NSC	B1	RG1 (тип 1)	Nestin, GFAP, CD133, Vimentin, Sox2, Pax6, Ascl1, BLBP, GLAST, CD133, LewisX (Lex)/CD15/SSEA-1, Egfr, Fgfr, LRIG1, VCAM1, Ki67, MCM2	Самоподдержание пула NSC; создание пула промежуточных нейрональных и глиальных предшественников и нейробластов
NSC/глиальные прогениторы	B2	RG2 (тип 2a)	Nestin, GFAP, Vimentin, Ascl1, Sox2, BLBP, Shh, IGF1, Tlx	Не известна, возможно – генерация астроцитов и олигодендроглиоцитов
Промежуточные прогениторы	C, TAPs	RG2 (тип 2b)	Nestin, Sox2, Pax6, BLBP, EGFR, Dcx, Dlx, GLAST, NT-3, Tbr2, Ascl1, NeuroD1, Prox1, Wnt, Shh, Igf1, Fgf2	Поддержание пула нейрональных предшественников, формирование пула нейробластов
Нейробласты	A	Тип 3	NeuroD1, Prox1, Dcx, NCAM, βIII-tubulin, Prox-1, NeuN, CRMP-4, GD3, BDNF, CREB, Dlx1, Dlx2, MAP2, Wnt, Notch, AP-1	V-SVZ: Миграция по ростральному миграционному пути, постмитотическое созревание и формирование пула зрелых нейронов обонятельной луковицы. SGZ: Перемещение в гранулярном слое, организация связей с CA3 и CA2 в фазе постмитотического созревания
Молодые нейроны			NCAM, βIII-tubulin, NeuN, GD3, BDNF, CREB, MAP2, AP-1, CalR, CalB, GABA, D2/D3, 5-HT	
Клетки эпендимы	E1 и E2	–	S100β, CD133, α-tubulin (C3B9), CD24, GLAST, mCD24, Sox2, Nestin, FoxJ1	Поддерживающая функция, формирование ниши стволовых клеток
Астроциты			GFAP, Vimentin, BLBP, s100β	Поддерживающая функция, формирование ниши стволовых клеток

ски напоминают взрослые радиальные астроциты (рис. 1, табл. 2). Аналогично астроцитам, клетки B1 окружают своими базальными отростками капилляры, с помощью апикальных отростков контактируют с ликворной системой (Mich et al., 2014; Obernier et al., 2019; Jurkowski et al., 2020). В результате асимметричного деления клетки B1 воспроизводят себя, образуют клетки B2, также имеющие астроглиальный фенотип, но лишенные апикальных контактов, а также промежуточные прогениторные клетки типа C (или TAPs), которые начинают активно пролиферировать, накапливая экспрессию пронейрональных генов *Ascl1* и *Dlx*. После 3–4 делений клетки типа C приобретают достаточный пронейрональный потенциал, чтобы в результате следующего деления образовать нейробласты (клетки типа A). Последние образуют ростральный миграционный путь, по которому они мигрируют в обонятельные луковицы, где в дальнейшем подвергаются постмитотическому созреванию (Mich et al., 2014; Obernier et al., 2019; Jurkowski et al., 2020). Для нейробластов V-SVZ характерна экспрессия пронейрональных генов, таких как *Dcx*, collapsin-response mediator protein-4 (CRMP-4), ганглиозид 9-O-ацетил GD3, NCAM и других белков клеточной адгезии и интегринов, обеспечивающих эффективную миграцию клеток в обонятельную луковицу (OB), которая дополнительно регулируется белками ECM, такими как тенасцин-2 и прокинетицин-2 (Jurkowski et al., 2020).

Интенсивность продукции нейробластов регулируется внешними и внутренними стимулами, зависит от возраста, физической активности, голодания и др. факторов. У молодых мышей продуцируется до 10000 мигрирующих нейробластов (клеток типа А) в сутки; при том, что общее количество клеток B1 в V-SVZ у них составляет около 7000 (Obernier et al., 2019), это намного больше, чем количество NSC в SGZ, т.е. V-SVZ является самой крупной герминативной зоной взрослого мозга.

SGZ

Мультипотентные NSC в SGZ зубчатой извилины называют клетками радиальной глии (RG) I типа. Эти клетки имеют астроглиальный фенотип (GFAP+, нестин+) и экспрессируют маркеры стволовости Sox2+ и CD133+ (табл. 2). Аналогично фибриллярным астроцитам и клеткам B1, клетки 1 типа оплетают своими отростками микрососуды, что делает их чувствительными к сигналам из микроциркуляторного русла и от церебральных эндотелиоцитов, в частности, к VEGF, который считается одним из индукторов нейрогенеза в SGZ (Kempermann et al., 2015). Получая активирующие сигналы, клетки I типа делятся преимущественно ассиметрично и дают начало прогениторным клеткам II типа, которые в свою очередь подразделяются на прогениторы 2a, имеющие астроглиальный фенотип и прогениторы 2b, которые дают начало молодым гранулярным нейронам (Kempermann et al., 2015; Ampuero et al., 2017). Прогениторные клетки 2 типа экспрессируют Sox2, Shh, Wnts, IGF1, FGF2 и ядерный белок Tlx (Abbott et al., 2020). Активация сигнальных путей Shh, Wnt, IGF1 и FGF2 способствует их дальнейшей дифференцировке, в то время как градиент концентрации IGF1 определяет направление их миграции (Nieto-Estevez et al., 2016).

Нейральные прогениторы типа 2b запускают экспрессию генов пронейрональных транскрипционных факторов Ascl1 Dcx, Nt-3, Tbr2, NeuroD1 и Prox 1 (Abbott et al., 2020) и в дальнейшем дифференцируются в клетки 3 типа (нейробласты), которые затем останавливают клеточный цикл и подвергаются постмитотическому созреванию (Kempermann et al., 2015). В процессе постмитотического созревания нейробласты (клетки III типа) приобретают полярную форму, выпуская дендриты в молекулярный слой GD, а аксоны – к нейронам CA3 зоны гиппокампа и меняют свою пространственную ориентацию, располагаясь более вертикально в гранулярном слое зубчатой извилины (Danzer et al., 2008). При дальнейшем созревании эти клетки формируют дендритные шипики в молекулярном слое зубчатой извилины, и удлиняют аксональные проекции в зону CA2 (Abbott et al., 2020).

В процессе постмитотического созревания, экспрессия ранних пронейрональных генов, характерных для клеток 3 типа (*Dcx, Wnt, Notch, NeuroD1* и *Prox1*) заменяется экспрессией генов более зрелых нейронов, таких как MAP2, BDNF, рилин, CREB, NeuN, кальретинин, активирующий белок 1 (AP-1) (табл. 2) (Gonçalves et al., 2016). Гликопротеин внеклеточного матрикса рилин важен для формирования дендритных шипиков, а также для миграции и позиционирования молодых нейронов в гранулярном слое зубчатой извилины (Ampuero et al., 2017). Фосфорилирование CREB активирует транскрипцию генов *c-Fos*, *Jun-B*, *Bcl-2*, *GDNF*, экспрессия которых важна для ветвления дендритов и дальнейшего выживания нейронов (Zhang et al., 2016). Белки c-Fos и c-Jun гетеродимеризуясь, образуют AP-1, активирующийся сигнальным каскадом Wnt и в свою очередь, регулирующий пролиферацию, дифференцировку и апоптоз нейронов зубчатой извилины гиппокампа (Salvi et al., 2016).

В регуляции нейрогенеза в GD большое значение имеет нейротрансмиттерный вход и состояние мембраны созревающего нейрона. Начиная с клеток радиальной глии 2 типа, все последующие субпопуляции прогениторов и нейронов SGZ оверэкспрессируют гены рецепторов ГАМК, что определяет их реакцию на ГАМКергические сигналы, генерируемые локальными интернейронами GD и другими структурами гиппокампа (Kempermann et al., 2015). Помимо ГАМК, пролиферацию и постмитотическое созревание NSC II типа регулируют серотонин и дофамин опосредованно через экспрессируемые ими гены дофаминовых (D2/D3) и серотониновых (5-HT) рецепторов (Salvi et al., 2016; Kohl et al., 2016). SGZ получает множество нейротрансмиттерных сигналов: дофаминергические из VTA (ventral tegmental area), серотонинергические из ядер шва (raphe nuclei), а также ацетилхолинергические из ядер перегородки.

В результате взрослого нейрогенеза в SGZ у грызунов генерируется только один тип нейронов – возбуждающие гранулярные нейроны зубчатой извилины, которые получают сигналы из энторинальной коры и передают возбуждающие импульсы нейронам в CA3 и CA2 зоны гиппокампа (Kempermann et al., 2015). Активируя тормозные интернейроны, вновь образованные гранулярные нейроны ингибируют общую активность GD, что имеет значение в когнитивной пластичности, в частности в улучшении различения близких паттернов (Anacker et al., 2017) (подробнее см. в разделе “Функции NSC взрослого мозга”).

КЛЮЧЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ

Нейрогенез во взрослом мозге не является уменьшенной копией эмбрионального нейрогенеза, но имеет свои особенности и ограничения. Несмотря на то, что и в позднем эмбриональном периоде и во взрослом состоянии молодые нейроны образуются из нейроглиальных радиальных предшественников (Ponti et al., 2017), взрослый нейрогенез принципиально отличается как микроокружением ниш стволовых клеток, так и молекулярными механизмами регуляции (Lugert et al., 2012).

Транскриптомные исследования показали, что паттерн экспрессии нейроэпителиальных радиальных предшественников в эмбриональном периоде наиболее близок к паттерну промежуточных нейрональных прогениторов (IPC или TAPs), в то время как транскриптом клеток радиальной глии V-SVZ и SGZ взрослого мозга ближе всего к транскриптому дифференцированных астроцитов и эпендимальных клеток (Gouti et al., 2015). Астроглия и эпендима в V-SVZ и астроглия в SGZ играют важную роль в функционировании взрослых ниш стволовых клеток, определяя ее преимущественную "глиогенность" (Paez-Gonzalez et al., 2011; Taverna et al., 2014). Эта особенность взрослого микроокружения приводит к тому, что в отличие от эмбриональных NSC, которые дифференцируются преимущественно в нейрональном направлении, взрослые NSC никогда не дифференцируются в нейроны напрямую и достаточно легко дифференцируются в астроциты (Taverna et al., 2014; Götz et al., 2016).

Примечательно, что при культивировании *in vitro*, в присутствии пронейрональных факторов, как эмбриональные, так и взрослые NSC достаточно легко дифференцируются в нейрональном направлении. Однако, при трансплантации NSC в паренхиму головного мозга взрослого животного как эмбриональные, так и взрослые NSC преимущественно дифференцируются в глиальном направлении (Götz et al., 2016; Samoilova et al., 2021). Исключение составляет трансплантация NSC в зубчатую извилину, в результате которой наблюдается нейрональная дифференцировка пересаженных клеток (Lugert et al., 2012; Fuentealba et al., 2012). Трансплантация нейрональных прогениторов в другие структуры взрослого мозга, в которых естественный нейрогенез отсутствует, приводит к торможению нейрональной дифференцировки, вследствие чего прогениторы либо сохраняют свой исходный фенотип, либо дифференцируются в глиальном направлении (Mira et al., 2010). При этом экспрессия пронейрональных генов, таких как *Pax6*, *Ascl1* и *Ngn2*, которая активно осуществляется у NSC *in vitro*, после трансплантации резко снижается, что и обусловливает потерю нейрональной дифференцировки *in vivo* во взрослом мозге (Barnabé-Heider et al., 2010; Torper et al., 2013).

Приведенные выше результаты и понимание организации ниш стволовых клеток во взрослом мозге позволяет сделать заключение, что взрослые NSC исходно "глиогенны" и способны к нейрогенезу только через промежуточные формы с постепенной активацией пронейрональных транскрипционных факторов и без этой транскрипционной поддержки могут легко сменить направление дифференцировки на глиогенез (Grande et al., 2013). Транскрипционная пронейрональная поддержка при взрослом нейрогенезе осуществляется теми же факторами, что и в эмбригенезе – Pax6, Gsx2, Dlx, Ascl1, Ngn2 и NeuroD1 (Lugert et al., 2012; Ninkovic et al., 2013). Однако, если эмбриональная радиальная глия исходно мультипотентна и способна к прямой пронейрональной дифференцировке, то взрослым NSC необходима серия промежуточных делений для наработки необходимого уровня пронейрональных транскрипционных факторов (Haubst et al., 2004; Costa et al., 2011; Grande et al., 2013; López-Juárez et al., 2013).

Еще одной важной особенностью взрослых NSC является продолжительный клеточный цикл. Эмбриональные NSC до позднего неонатального периода не переходят в состояние покоя и их клеточный цикл длится 10–18 ч, в то время как взрослые NSC, периодически переходя в покоящееся состояние, могут иметь продолжительность клеточного цикла от нескольких суток до двух недель и более (Arai et al., 2011; Bonaguidi et al., 2011; Sohn et al., 2015).

Таким образом, взрослые NSC – специальный, обосабливающийся еще в пренатальном периоде развития пул клеток, имеющий свои особые функции и механизмы регуляции покоя, пролиферации и дифференцировки. В довершении к уже перечисленным свойствам взрослых NSC (пребывание в состоянии покоя, способность к самоподдержанию, способность генерировать промежуточные прогениторные формы из которых развиваются нейроны и глия), можно добавить еще одну ключевую характеристику – это неспособность к прямой нейрональной дифференцировке (Lugert et al., 2012; Götz et al., 2016), которая, вероятнее всего обусловливается глиогенным влиянием микроокружения. Эту исходную "глиогенность" микроокружения взрослого мозга необходимо учитывать при разработке всех нейрорегенеративных технологий, включающих нейрональную дифференцировку.

ФУНКЦИИ NSC ВЗРОСЛОГО МОЗГА

В нише стволовых клеток в V-SVZ в течение жизни мелких млекопитающих образуются сотни миллионов молодых ольфакторных нейронов, которые затем мигрируют оттуда в обонятельную луковицу, формируя ростральный миграционный путь (Jurkowski et al., 2020). Десятки тысяч молодых нейронов, образующихся в SGZ, занимают свое место в гранулярном слое зубчатой извилины. Логично предположить, что и в V-SVZ и в SGZ новые нейроны замещают функции по тем или иным причинам деградирующих нейронов, однако это не совсем так. В последние двадцать лет, с развитием генетических технологий появились новые инструменты для исследования функций новообразованных нейронов. Были, например, получены трансгенные мыши, у которых можно произвести субтотальную деплецию пролиферирующих NSC. Так, у трансгенных мышей *Gfap-tk* в геном встроен ген тимидинкиназы вируса простого герпеса под контролем промотора GFAP, вследствие чего все пролиферирующие взрослые NSC становятся чувствительны к противовирусному препарату Valganciclovir (VGCC). Если во взрослом состоянии трансгенным мышам *Gfap-tk* ввести этот препарат, все пролиферирующие NSC подвергаются массированному апоптозу и нейрогенез в церебральных нишах стволовых клеток полностью останавливается (Snyder et al., 2011).

В V-SVZ около 95% новых нейронов дифференцируются в гранулярные клетки (GCs). Подавляющее большинство из оставшихся 5% клеток становятся перигломерулярными клетками (Lledo et al., 2006). И те, и другие являются ГАМКергическими ингибиторными нейронами. Посредством дендрит-дендритных реципрокных связей GCs ингибируют митральные клетки, главные нейроны обонятельной луковицы (Li et al., 2018). Эксперименты с выключением нейрогенеза во взрослом состоянии у трансгенных мышей показали, что животные, у которых нарушено образование молодых ольфакторных нейронов, в целом не отличаются от здоровых мышей, но перестают различать похожие запахи вследствие обеднения паттернов распознавания в митральных клетках OB, обусловленного, вероятно, уменьшением супрессивного воздействия на них ингибиторных гранулярных и перигломерулярных ГАМКергических нейронов, популяция которых обновляется за счет молодых нейронов (Li et al., 2018).

Образованные в результате взрослого нейрогенеза в SGZ молодые нейроны дифференцируются в возбуждающие нейроны и занимают место в гранулярном слое зубчатой извилине. Аксоны этих клеток образуют моховидные волокна, идущие в CA3 и CA2 зоны гиппокампа, где они заканчиваются в виде “синаптических бляшек” в зонах, богатых интернейронами. В течение нескольких недель после образования эти нейроны можно обнаружить по усиленному синаптогенезу и нейрональной пластичности, затем, примерно после 8 недели они становятся неотличимы от взрослых нейронов гранулярного слоя GD (Sailor et al., 2016). Основная функция нейронов гранулярного слоя – передача импульсов в пирамидные клетки CA3 зоны гиппокампа. Эти нейроны передают импульсы довольно редко и их активность реципрокно модулируется большим количеством интернейронов гиппокампа (Kempermann et al., 2015). Результирующим влиянием новообразованных нейронов, вследствие активации локальных тормозных интернейронов является торможение общей активности GD (Anacker et al., 2017). Консолидацию новообразованных нейронов GD в функции гиппокампа, связывают с общей нейрональной пластичностью в процессе когнитивной деятельности, имеющей важное значение при распознавании близких паттернов в процессе обучения, функционировании памяти, а также при адаптивной регуляции эмоциональной сферы (Lledo et al., 2006; Snyder et al., 2011; Sailor et al., 2016; Li et al., 2018; Anacker et al., 2017; Ruddy et al., 2018; Fares et al., 2019; Toda et al., 2019; Jurkowski et al., 2020).

Эксперименты с выключением взрослого нейрогенеза у трансгенных мышей обнаружили, что новообразованные нейроны играют важную роль не только в решении когнитивных задач, но и в реципрокной инактивации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, активирующейся в ответ на стресс. Так, у трансгенных мышей с деплецией нейрогенеза обнаружили более продолжительное повышение уровня кортикостерона – основного глюкокортикоидного гормона у грызунов – в ответ на острый стресс. Эти мыши показали повышенное пищевое избегание в новом окружении, повышенное истощение в тесте принудительного плавания и другие эквиваленты депрессивного поведения. Это позволило сделать вывод о том, что новообразованные нейроны GD играют важную роль в антистрессорной адаптации организма (Snyder et al., 2011). Важно отметить, что в том же исследовании было показано, что ни циркадные колебания уровня кортикостерона, ни исходный максимум его повышения в ответ на стресс у мышей с деплецией нейрогенеза и диких мышей не отличаются, что еще раз свидетельствует о том, что взрослый нейрогенез не является жизненно необходимым, а относится к механизмам “тонкой настройки” нейроэндокринной системы к окружающей среде. Адаптационная роль взрослого нейрогенеза подчеркивается поведенческими и эмоциональными нарушениями, возникающими при его нарушениях (Anacker et al., 2017).

Как мы уже отмечали выше, радиоуглеродный анализ показал наличие нейрогенеза в SGZ GD гиппокампа взрослого человека (Spalding et al., 2013), однако, иммуногистохимические исследования не подтвердили наличие сколь-либо заметного нейрогенеза у детей старше 13 лет и аналогичных по возрасту нечеловекообразных приматов (Sorrells et al., 2018). В другой работе с иммуногистохимическим исследованием препаратов мозга человека показано, что молодые нейроны обнаруживаются в гиппокампе только у детей до трех лет, в дальнейшем в SGZ пролиферирует только микроглия (Dennis et al., 2016). В этой связи, говорить о функции нейрогенеза у приматов и человека справедливо, по крайней мере применительно к раннему детскому возрасту. В этом возрасте активный нейрогенез связывают с развитием когнитивных функций, способностей обучения и памяти. В то же время, до сих пор всерьез обсуждается роль постнатального нейрогенеза в развитии нейродегенеративных и психических нарушений у взрослых, включая депрессию, и даже болезнь Альцгеймера (Anacker et al., 2017; Berger et al., 2020).

Резюмируя данные исследований у лабораторных животных, можно заключить, что функция новых нейронов, образующихся в процессе взрослого нейрогенеза — участие в процессинге новой информации, поступающей в течение жизни, обеспечивающее когнитивную пластичность и тонкую адаптацию к условиям окружающей среды.

Можно предположить, что именно с выполнением специализированных функций, характерных для определенных нейронных систем мозга связана малоэффективная реакция взрослых NSC в условиях патологии.

РОЛЬ РЕЗИДЕНТНЫХ NSC ПРИ ПАТОЛОГИИ

Роль взрослых NSC при патологии ЦНС в подавляющем большинстве опубликованных работ исследовалась на моделях патологии головного мозга у мелких лабораторных грызунов. Наиболее изучены в этом отношении четыре модели самых частых церебральных катастроф: 1) модель неонатальной гипоксии, воспроизводящей гипоксико-ишемическую энцефалопатию новорожденных; 2) различные варианты травматического повреждения головного мозга (механическая травма, химическая деплеция, лучевое поражение) и различные модели ишемии во взрослом состоянии (фототромбоз, окклюзия средней мозговой артерии и др.), воспроизводящих ишемический инсульт у взрослых (Ruddy et al., 2018).

При заболеваниях и травмах ЦНС происходят глобальные изменения церебрального гомеостаза, затрагивающие в том числе и ниши стволовых клеток мозга. Системные воспалительные сигналы при патологии ЦНС достигают V-SVZ и SGZ через микрососудистое русло, или выделяются в нише реактивной микроглией и инфильтрирующими иммунными клетками. Ряд провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкин-6 напрямую воздействует на NSC через соответствующие рецепторы (Storer et al., 2018). Универсальной реакцией стволовой ниши в ответ на любые патологические изменения является активация нейрогенеза. Такая активация во взрослом мозге мышей показана в ответ на массивную гибель нейронов при инсультах, черепно-мозговых травмах, нейродегенеративных заболеваниях, эпилепсии и пр. (Lledo et al., 2006; Snyder et al., 2011; Sailor et al., 2016; Ruddy et al., 2018; Fares et al., 2019; Toda et al., 2019; Jurkowski et al., 2020). Облучение стволовых ниш, хирургическая резекция или химическая деплеция нейрогенеза цитозин-арабинозидом или 5-фторурацилом также неизбежно приводят к активации уцелевших qNSC, усилению пролиферации активированных NSC, а также всех промежуточных прогениторов (Urbán et al., 2019).

Гипоксико-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) у новорожденных мышей характеризуется массированным повреждением в области стриатума, расширением боковых желудочков, нарушениями секреторной функции хориодного сплетения, массивным апоптозом нейробластов в пределах стволовой ниши (Ruddy et al., 2018). Вместе с тем, уже через неделю после экспериментальной ГИЭ наблюдается значительное увеличение количества BrdU+ и Dcx+ положительных пролиферирующих нейробластов — как в V-SVZ на стороне ГИЭ, так и в V-SVZ на контралатеральной стороне (Ong et al., 2005). В активации пролиферации нейробластов в ответ на ГИЭ определенную роль играет оверэкспрессия *Notch1*, *Delta-like 1*, и *Jagged1* (Felling et al., 2016). Примечательно, что активацию сигналлинга Notch1 может запускать фактор, ингибирующий лейкемию (LIF, leukemia-inhibitory factor), который активируется в реактивных астроцитах в результате травмы. Мы еще будем упоминать этот фактор ниже, при рассмотрении протоколов репрограммирования.

Транскриптомный анализ показал, что в ответ на гипоксико-ишемическое повреждение qNSC кардинально меняют метаболизм, усиливают синтез белка и индуцируют экспрессию транскрипционных факторов (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Примечательно, что паттерн экспрессии NSC в ответ на ишемию очень похож на паттерн экспрессии сателлитных стволовых клеток мышечной ткани, что свидетельствует о том, что в qNSC, вероятно, включается универсальная программа генетической экспрессии, одинаковая для различных тканей в условиях тканевой гипоксии (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Очевидно, что данная программа имеет непосредственное отношение к репаративной клеточной регенерации, однако, не менее очевидно, что эффективность ее реализации при патологии головного мозга млекопитающих низка. Большое количество исследований посвящено различным подходам по улучшению репаративной регенерации за счет NSC путем дополнительной активации их выживания, пролиферации и миграции с помощью различных биологически активных факторов, таких, как уже упомянутый LIF, малых молекул (метформин, ионы лития), клеточной терапии и пр. (Dadwal et al., 2015; Felling et al., 2016; Ruddy et al., 2018). У мелких грызунов подобные подходы подчас способствуют эффективному восстановлению утраченных функций, однако вероятность их успешной трансляции на патологию человека минимальна.

Обсуждая регенерацию у рыб и амфибий, мы упоминали о репрограммировании с дедифференцировкой и приобретением стволовости, которому подвергаются резидентные клетки в очаге патологии, что вместе с ремоделированием ECM создает уникальные условия для восстановления структур ЦНС *de novo* (Maden et al., 2013; Goldman et al., 2014). Примечательно, что в стриатуме и медиальной коре у мышей также наблюдали феномен дедифференцировки астроцитов с образованием Ascl1-позитивных нейрональных прогениторов, способных к генерации молодых нейронов (Nato et al., 2015; Magnusson et al., 2020). Обязательным условием такой трансформации является супрессия сигнального пути Notch, что свидетельствует о том, что активность этого пути не только обеспечивает состояние покоя NSC, но и препятствует дедифференцировке астроглии (Magnusson et al., 2020).

СТАРЕНИЕ NSC – ОСОБЕННОСТИ МИКРООКРУЖЕНИЯ?

Старение – процесс, характеризующийся постепенно нарастающими нарушениями гомеостаза, затрагивающими все ниши резидентных стволовых клеток, в том числе и в головном мозге (Samoilova et al., 2021). Вместе с тем, старение NSC имеет свои уникальные особенности. Несмотря на то, что нейрогенез сохраняется в мозге на протяжении всей жизни, интенсивность его в процессе старения мозга заметно снижается вследствие уменьшения пула пролиферирующих NSCs (Basak et al., 2018). Новейшие исследования показали, что в процессе старения мозга, в V-SVZ и SGZ происходят два параллельных процесса – уменьшение общего количества Nestin+ Mcm2+ NSC и увеличение доли qNSC (Nestin+ Mcm2–) (Ibrayeva et al., 2021). То есть, снижение нейрогенеза с возрастом может быть обусловлено переходом большой доли NSC в покоящееся состояние, вследствие снижения с возрастом активирующих сигналов (Urbán et al., 2019). Было обнаружено, что NSC в V-SVZ старых мышей становятся менее чувствительны к сигналам активации при травме мозга, однако, активировавшись старые NSC не отличаются от юных по уровню пролиферации и дифференцировки (Kalamakis et al., 2019); возрастные изменения транскриптома активированных старых NSC также не были обнаружены, что позволяет предположить, что старение ниш стволовых клеток в меньшей степени затрагивает покоящиеся на протяжении жизни NSC по сравнению с их окружением. Старение микроокружения ниши стволовых клеток проявляется снижением сывороточного уровня важных сигнальных молекул, таких как инсулин и IGF, снижением секреторной активности хориоидного сплетения, локальным изменением активности сигнальных путей, в частности, инактивацией пути Wnt его антагонистом sFRP5 (Kalamakis et al., 2019), изменением соотношения IGF-1/BMP5 и др., что суммарно приводит к увеличению доли покоящихся NSC (Urbán et al., 2019; Kalamakis et al., 2019; Ibrayeva et al., 2021).

В отличие от других резидентных стволовых клеток, функции “старых” NSCs могут быть быстро нормализованы до состояния “молодых” при стимуляции *in vitro*. Так, кондиционированная среда от клеток хориоидного сплетения молодых мышей стимулирует пролиферацию старых NSC и наоборот – среда от клеток хориоидного сплетения старых мышей инактивирует пролиферацию юных NSC, вследствие изменения соотношения BMP5 и IGF1 (Smith et al., 2015). Эксперименты с гетерохронным парабиозом (объединением кровеносных систем молодых и старых мышей) показали, что перфузия мозга старых мышей кровью молодых приводит к восстановлению уровней IGF-1, GH, Wnt3, TGF-β или GDF11 у старых мышей до “молодого” уровня, что существенно активирует нейрогенез и когнитивные функции (Okamoto et al., 2011; Pineda et al., 2013; Katsimpardi et al., 2014; Villeda et al., 2014). Интересно, что ряд ассоциированных с возрастом факторов так или иначе связаны с иммунным ответом и воспалением. Помимо уже упомянутого TGF-β, которые наряду с влиянием на нейрогенез является индуктором Т-клеток, отмечается роль β2-микроглобулина в старении ниш NSC и возрастном ухудшении когнитивных функций (Smith et al., 2015). Интересные результаты были обнаружены Dulken и соавт., которые провели секвенирование 14685 отдельных клеток в стволовых нишах молодых и старых мышей (Dulken et al., 2019). Это прецизионное исследование подтвердило предположение о том, что с возрастом уменьшается количество активированных NSC. Были также обнаружены возрастные изменения транскриптома эндотелиальных клеток и микроглии, а также, что интересно – увеличение Т-клеточной инфильтрации в стареющих нишах стволовых клеток. Обнаруженные в мозге Т-клетки по репертуару Т-клеточных рецепторов отличались от Т-клеток в периферической крови тех же старых мышей, что позволило авторам предположить, что возможно, они активированы какими-то церебральными антигенами (Dulken et al., 2019). Т-клетки в старом мозге экспрессировали γ-интерферон, при этом субпопуляции NSC, отвечающие на интереферон, характеризовались сниженным уровнем пролиферации *in vivo*. Эксперименты *in vitro* также показали, что Т-клетки могут ингибировать пролиферацию NSC при кокультивировании, в т.ч. посредством секреции интерферона. Таким образом, иммунные механизмы могут играть свою особую роль в старении церебральных ниш стволовых клеток и в возрастном снижении когнитивных функций (Dulken et al., 2019).

Несмотря на то, что транскриптомные исследования не обнаружили обусловленных возрастом изменений генетической экспрессии в старых NSC, старение затрагивает и непосредственно NSC, что проявляется биохимическими нарушениями, в частности, дисфункцией лизосом, проявляющейся нарушением деградации белков и внутриклеточной аккумуляцией белковых агрегатов (Kalamakis et al., 2019). Различные субпопуляции NSC в V-SVZ имеют кардинальные различия в белковом гомеостазе. Так, активированные NSC характеризуются наличием активных протеасом, в то время как qNSC аккумулируют белковые агрегаты в крупных лизосомах. Лизосомальная активность NSC снижается с возрастом, что приводит к аккумуляции белковых агрегатов и потери способности к активации. Стимуляция функции лизсосом предотвращает это связанное со старением снижение активности (Leeman et al., 2018).

Ibrayeva et al., продемонстрировавшие, что популяция активированных гипокампальных NSC у мышей значительно уменьшается с возрастом, обнаружили определенные молекулярные признаки старения, в числе которых было увеличение экспрессии Abl1 (Ibrayeva et al., 2021). Ингибитор Abl иматиниб может, по мнению авторов, частично восстанавливать функцию стареющих NSC и замедлить процесс их старения.

Изменения в нишах NSC при старении человека гораздо менее изучены, вместе с тем, подавляющее большинство исследователей считают, что взрослый нейрогенез драматически снижается с возрастом, начиная от первого года постнатальной жизни (Spalding et al., 2013; Dennis et al., 2016; Sorrells et al., 2018). Таким образом, и без того низкий регенеративный потенциал головного и спинного мозга человека с возрастом, на который приходится дебют подавляющего большинства нейродегенеративных заболеваний, становится еще меньше. Это обстоятельство побуждает ученых искать альтернативные источники нейральных стволовых клеток для регенеративной терапии.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПОРАЖЕНИЙ ЦНС

Среди альтернативных подходов к получению аутологичных нейральных стволовых и прогениторных клеток, обладающих бóльшим регенераторным потенциалом, чем резидентные NSC, особое место занимает прямое репрограммирование соматических клеток в пронейрональном направлении (Ahlfors et al., 2019). Идея прямого репрограммирования дифференцированных аутологичных соматических клеток до уровня стволовых и прогениторных клеток с целью создания регенеративных технологий также заимствована у природы. При изучении регенерации у данио рерио и аксолотля был обнаружен феномен репрограммирования и дедифференцировки клеток в зоне повреждения с образованием мультипотентных стволовых клеток. Примером для регенерации нервной системы являются уже упомянутые клетки Мюллера, которые при повреждении сетчатки репрограммируются в нейрональные прогениторы и восстанавливают таким образом нейроны сетчатки (Goldman et al., 2014). У млекопитающих глия Мюллера теряет способность к репрограммирование *in vivo*, однако, в экспериментах *in vitro* можно создать такие условия, при которых глиальные клетки образуют нейрональные прогениторы и затем – нейроны (Goldman et al., 2014).

Эпоха клеточного репрограммирования началась в 2006 году, когда Yamanaka и Takahashi (Takahashi et al., 2006) впервые продемонстрировали технологию создания плюрипотентных клеток из фибробластов мыши посредством ретровирусной трансдукции генов четырех транскрипционных факторов: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Эти четыре транскрипционных фактора с тех пор известны как “факторы Яманаки” или факторы OSKM. Вместе с тем, репрограммирование до состояния плюрипотентной стволовой клетки сопровождается “обнулением” эпигенетического статуса клетки, возникновением геномной нестабильности и терратогенности. Технология прямого репрограммирования до уровня нейральных стволовых/прогениторных клеток лишена этих недостатков (для обзора см. Samoylova et al., 2020; Samoilova et al., 2021). С помощью прямого репрограммирования нейральные прогениторы, способные дать начало специализированным нейронам, могут быть получены из легко доступных аутологичных соматических клеток (Mall et al., 2017; Tanabe et al., 2018; Ahlfors et al., 2019). Прямое репрограммирование, позволяющее миновать потенциально небезопасную стадию индуцированной плюрипотентности, сохраняет эпигенетический “портрет” исходной клетки (Victor et al., 2018). Сохранение возраста репрограммированных клеток обусловливает предпочтительное применение прямого репрограммирования для создания моделей возрастных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Гентингтона (Victor et al., 2018).

Прямое репрограммирование в нейрональном направлении проводят с помощью трансдукции генами первичных и вторичных транскрипционных факторов, опосредующих эмбриональный и/или взрослый нейрогенез (Samoilova et al., 2021). Это такие факторы, как Sox2, Pax6, Msi1, Ascl1, Brn2, Neurogenins, NeuroD1, Myt1l, Gsx2, Dlx. При этом в результате прямого репрограммирования могут быть получены любые клеточные типы из онтогенетического ряда от мультипотентных нейральных стволовых клеток и комитированных нейрональных и глиальных прогениторных клеток до нейробластов и “молодых” нейронов, экспрессирующих базовые нейрональные маркеры. Важным аспектом прямого репрограммирования является инактивация супрессии нейрон-специфических генов у исходных соматических клеток, а также преодоление исходной “глиогенности” микроокружения взрослого мозга (Samoilova et al., 2021). Полученные в результате репрограммирования клетки способны к нейрональной дифференцировке.

Дальнейшее развитие технологии репрограммирования, возможно, позволит создать универсальный протокол, объединяющий в себе положительные черты как репрограммирования через стадию индуцированной плюрипотентности (IPS) (“обнуление” связанного с возрастом паттерна ДНК-метилирования, высокий регенераторный потенциал) так и прямого репрограммирования (отсутствие генетической нестабильности и повышенного риска хромосомных аберраций, быстрота, приемлемая стоимость). Уже сейчас описано получение индуцированных нейронов без стадии IPS (т.е. по сути – методом прямого репрограммирования) без экспрессии *OCT-4* приводящего к промежуточной стадии плюрипотентности (Sheng et al., 2018). Репрограммирование клеток периферической крови (эритробласты) выполняли с помощью неинтегрирующихся векторов на основе вируса Сендай с генами *SOX2* и *c-MYC*. Для облегчения репрограммирования в среду добавляли ингибитор GSK3β – CHIR99021, активатор пути SHH – purmorphamine, ингибитор ALK-5 – A83-01, рекомбинантный LIF и tranylcypromine. Полученные в результате этого протокола индуцированные нейроны в течение двух недель от начала репрограммирования оверэкспрессировали пронейрональные гены *SOX2*, *NES*, *PAX6* и *CDH2*, при этом экспрессия главного гена плюрипотентности – *OCT4* отсутствовала, что свидетельствовало о том, что репрограммирование из гемопоэтической клетки в нейральную прошло без промежуточной IPS-подобной стадии. Через три недели спонтанной дифференцировки полученные молодые нейроны экспрессировали TUJ1+, через 6 недель MAP2 и NeuN, затем была показана их возможность дифференцироваться в глутаматергические, ГАМКергические и серотонинергические нейроны с формированием соответствующих электрофизиологических паттернов. Уникальность этого исследования заключается в том, что авторы показали, что их протокол сопровождается “стиранием” возраст-зависимого профиля метилирования ДНК и омоложением клеток при оценке с помощью эпигенетических часов Horvath (Sheng et al., 2018). Последний факт немаловажен для создания регенеративных технологий, поскольку приближает репрограммированные клетки к фетальным НСК, способным к активному нейрогенезу.

Многочисленные экспериментальные исследования прямо репрограммированных нейроглиальных прогениторных клеток (drNPC) на мелких лабораторных животных показали, что их трансплантация может быть эффективна в терапии экспериментального инсульта (Vonderwalde et al., 2019; Namestnikova et al., 2021) и спинальной травмы (Nagoshi et al., 2018; Nori et al., 2018). При этом drNPC способствовали синаптогенезу, ремиелинизации и функциональному восстановлению неврологического дефицита. Поскольку на мелких лабораторных животных применялась ксеногенная трансплантация drNPC человека, факт нейрональной дифференцировки пересаженных клеток зарегистрирован не был. Частичная нейрональная дифференцировка была показана в экспериментах на крупных лабораторных животных – нечеловекообразных приматах при трансплантации drNPC в составе тканеинженерных конструктов (Baklaushev et al., 2019). Эффективность трансплантированных drNPC была также подтверждена в экспериментах на нечеловекообразных приматах с экспериментальной спинальной травмой, у которых также было показано восстановление соматосенсорных и двигательных вызванных потенциалов, хотя нейрональная дифференцировка пересаженных drNPC в этом исследовании и не обнаруживалась (Baklaushev et al., 2021).

Новой эпохой в регенеративной терапии заболеваний и травм нервной системы может стать репрограммирование *in situ*, когда, с помощью различных подходов, может быть запущена трансдифференцировка в нейрональном направлении резидентных глиальных и/или мезенхимальных клеток непосредственно в структурах головного мозга. Уже сейчас получены первые доказательства того, что такой подход в принципе возможен. В частности, показано, что деплеция РНК-связывающего белка PTB, через который реализуется блокирующее действие REST на нейрональные транскрипционные факторы запускает программу нейрональной дифференцировки астроцитов у крыс с 6-OHDA гемипаркинсонизмом (Qian et al., 2020). В будущем технология прямого репрограммирования *in situ* до терминально дифференцированных нейронов (дофаминергических, ацетилхолинергических, серотонинергических и пр.) может позволить решить проблему болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессивной нейрональной гибелью (Arenas, 2020).

Таким образом, в дополнение к технологии получения клеток с индуцированной плюрипотентностью, прямое репрограммирование соматических клеток в нейроглиальном направлении открывает новые возможности для развития персонализированной медицины, от разработки *in vitro* моделей наследственных и дегенеративных неврологических заболеваний в случае репрограммирования с сохранением эпигенетического возраста, до создания нейрорегенеративных технологий — при репрограммировании с “омоложением” паттерна метилирования ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У млекопитающих взрослые NSC выполняют специализированные функции: в V-SVZ это генерация определенных типов ольфакторных нейронов, необходимых для различения похожих запахов, в зубчатой извилине — это генерация гранулярных нейронов для включения в нейральные цепи, осуществляющие запоминание образов и обучение на протяжении всей жизни. У мелких лабораторных млекопитающих взрослые NSC не приспособлены обеспечивать регенерацию за пределами зон их компетенции, несмотря на выраженную активацию их пролиферации в условиях патологии. У высших приматов и человека многими исследователями ставится под сомнение возможность сколь-либо заметного нейрогенеза во взрослом состоянии. Отсутствие активного нейрогенеза во взрослом мозге человека делает бесперспективными все попытки активации клеточной регенерации за счет резидентных NSC, в той или иной степени эффективные у крыс и мышей. Альтернативой взрослым NSC могут быть трансплантаты репрограммированных нейральных прогениторных клеток, которые, в отличие от первых, характеризуются повышенной способностью к нейрональной дифференцировке, несмотря на воспалительное микроокружение взрослого мозга, и потенциально способны восстановить утраченные в результате заболеваний и травм ЦНС популяции нейронов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны чл.-корр. РАН, д. б. н., профессору А.В. Васильеву за идею написания обзора. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20110).

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

В.П. Баклаушев, В.В. Белопасов — идея обзора, написание рукописи, Е.М. Самойлова — сбор материала, оформление рукописи, подготовка рисунка. Г.М. Юсубалиева — сбор материала, подготовка рукописи. Все авторы приняли участие в редактировании рукописи.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ACSL1	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1
BLBP	Brain lipid-binding protein
BMP	Bone morphogenetic protein
BrdU	Bromodeoxyuridine
CalB	Calbindin
CalR	Calreticulin
CD	Claster of Differentiation
CSF	Cerebrospinal fluid
CRMP-4	Collapsin-response mediator protein-4
ctgf	Connective tissue growth factor
drNPC	Directly reprogrammed neural precursor cell
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GC	Granule cell
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Gliofibrillar acidic protein
GLAST	GLutamate ASpartate Transporter
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
IGF1	Insulin like growth factor 1
IL	Interleukin
IPC	Intermediate progenitor cells
IPS	Induced pluripotent stem cell
LIF	Leukemia-inhibitory factor
LRIG1	Leucine Rich Repeats and Immunoglobulin Like Domains 1
LV	Lateral ventricle
MCM	Mini-chromosome maintenance proteins
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NSC	Neural stem cell
OB	Olfactory bulb
p-qNSC	Primed quiescent neural stem cells
PTB	Polypyrimidine-tract-binding protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
qNSC	Quiescence Neural Stem Cells
REST	RE1-Silencing Transcription factor

sFRP5	Secreted Frizzled Related Protein 5
SGZ	Subgranular zone
SHH	Sonic hedgehog
TAP	Transit-amplifying progenitor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
V-SVZ	Ventricular-subventricular zone
ГАМК	Гамма аминомасляная кислота
ГИЭ	Гипоксико-ишемическая энцефалопатия
РГ	Радиальная глия
ЦНС	Центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus // Anat. Histol. Embryol. 2020. V. 49. № 1. P. 3–16.

Aguirre A., Rubio M.E., Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal // Nature. 2010. V. 467. № 7313. P. 323–327.

Ahlfors J.E., Azimi A., El-Ayoubi R. et al. Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells // Stem Cell Res. Ther. 2019. V. 10. № 1. P. 166.

Alfonso J., Le Magueresse C., Zuccotti A. et al. Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. P. 76–87.

Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? // Science. 1962. V. 135. № 3509. P. 1127–1128.

Ampuero E., Jury N., Hartel S. et al. Interfering of the Reelin/ApoER2/PSD95 signaling axis re-activates dendritogenesis of mature hippocampal neurons // J. Cell. Physiol. 2017. V. 232. № 5. P. 1187–1199.

Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility – linking memory and mood // Nat. Rev. Neurosci. 2017. V. 18. № 6. P. 335–346.

Andreu Z., Khan M.A., González-Gómez P. et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1 regulates radial stem cell quiescence and neurogenesis in the adult hippocampus // Stem Cells. 2015. V. 33. P. 219–229.

Andreu-Agulló C., Morante-Redolat J.M., Delgado A.C. et al. Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone // Nat. Neurosci. 2009. V. 12. P. 1514–1523.

Arai Y., Pulvers J.N., Haffner C. et al. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production // Nat. Commun. 2011. V. 2. P. 154.

Arenas E. Method to combat Parkinson's disease by astrocyte-to-neuron conversion // Nature. 2020. V. 582(7813). P. 489–490.

Artegiani B., Lindemann D., Calegari F. Overexpression of *cdk4* and *cyclinD1* triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain // J. Exp. Med. 2011. V. 208. P. 937–948.

Artegiani B., Lyubimova A., Muraro M. et al. Single-cell RNA sequencing study reveals cellular and molecular dynamics of the hippocampal neurogenic niche // Cell Rep. 2017. V. 21. № 11. P. 3271–3284.

Bai G., Sheng N., Xie Z. et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit preco cious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1 // Dev. Cell. 2007. V. 13. P. 283–297.

Baker S.A., Baker K.A., Hagg T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 20. P. 575–579.

Baklaushev V.P., Bogush V.G., Kalsin V.A. et al. Tissue engineered neural constructs composed of neural precursor cells, recombinant spidroin and prp for neural tissue regeneration // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 3161.

Baklaushev V.P., Durov O.V., Kalsin V.A. et al. Disease modifying treatment of spinal cord injury with directly reprogrammed neural precursor cells in non-human primates // World J. Stem Cells. 2021. V. 13. № 5. P. 452–469.

Barnabé-Heider F., Göritz C., Sabelström H. et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 4. P. 470–482.

Basak O., Giachino C., Fiorini E. et al. Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state // J. Neurosci. 2012. V. 32. P. 5654–5666.

Basak O., Krieger T.G., Muraro M.J. et al. Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 4. P. E610–E619.

Baser A., Skabkin M., Kleber S. et al. Onset of differentiation is post-transcriptionally controlled in adult neural stem cells // Nature. 2019. V. 566. № 7742. P. 100–104.

Bauer S., Patterson P.H. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 12089–12099.

Berger T., Lee H., Young A.H. et al. Adult hippocampal neurogenesis in major depressive disorder and alzheimer's disease // Trends Mol. Med. 2020. V. 26. № 9. P. 803–818.

Bergmann O., Liebl J., Bernard S. et al. The age of olfactory bulb neurons in humans // Neuron. 2012. V. 74. № 4. P. 634–639.

Boldrini M., Fulmore C.A., Tartt A.N. et al. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging // Cell Stem Cell. 2018. V. 22 № 4. P. 589–599. e5.

Bonaguidi M.A., Wheeler M.A., Shapiro J.S. et al. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics // Cell. 2011. V. 145. P. 1142–1155.

Bowman A.N., van Amerongen R., Palmer T.D. et al. Line age tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/b-catenin-responsive neural stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 7324–7329.

Brooker S.M., Bond A.M., Peng C.Y. et al. β1-Integrin restricts astrocytic differentiation of adult hippocampal neural stem cells // Glia. 2016. V. 64. P. 1235–1251.

Burd G.D, Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain // J. Comp. Neurol. 1985. V. 240. № 2. P. 143–152.

Chaker Z., Codega P., Doetsch F. A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2016. V. 5. № 6. P. 640–658.

Chirivella L., Kirstein M., Ferrón S.R. et al. Cyclin-dependent kinase 4 regulates adult neural stem cell proliferation and differentiation in response to insulin // Stem Cells. 2017. V. 35. P. 2403–2416.

Codega P., Silva-Vargas V., Paul A. et al. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their *in vivo* niche // Neuron. 2014. V. 82. № 3. P. 545–559.

Costa M.R., Ortega F., Brill M.S. et al. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression *in vitro* // Development. 2011. V. 138. № 6. P. 1057–1068.

Dadwal P., Mahmud N., Sinai L. et al. Activating endogenous neural precursor cells using metformin leads to neural repair and functional recovery in a model of childhood brain injury // Stem Cell Rep. 2015. V. 5. № 2. P. 166–173.

Danzer S.C., Kotloski R.J., Walter C. et al. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB // Hippocampus. 2008. V. 18. № 7. P. 668–678.

Delgado A.C., Ferrón S.R., Vicente D. et al. Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction // Neuron. 2014. V. 83. P. 572–585.

Demircan T. Dissecting the molecular signature of spinal cord regeneration in the axolotl model // Cureus. 2020. V. 12. № 2. P. 7014.

Dennis C.V., Suh L.S., Rodriguez M.L. et al. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2016. V. 42. № 7. P. 621–638.

Douet V., Arikawa-Hirasawa E., Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate BMP-7 inhibition of cell proliferation in the adult subventricular zone // Neurosci. Lett. 2012. V. 528. P. 120–125.

Douet V., Kerever A., Arikawa-Hirasawa E. et al. Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone // Cell Prolif. 2013. V. 46. P. 137–145.

Dulken B.W., Buckley M.T., Navarro Negredo P. et al. Single-cell analysis reveals T cell infiltration in old neurogenic niches // Nature. 2019. V. 571. № 7764. P. 205–210.

Fares J., Bou Diab Z., Nabha S. et al. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles // Int. J. Neurosci. 2019. V. 129. № 6. P. 598–611.

Felling R.J., Covey M.V., Wolujewicz P. et al. Astrocyte-produced leukemia inhibitory factor expands the neural stem/progenitor pool following perinatal hypoxia-ischemia // J. Neurosci. Res. 2016. V. 94. № 12. P. 1531–1545.

Franjic D., Skarica M., Ma S. et al. Transcriptomic taxonomy and neurogenic trajectories of adult human, macaque, and pig hippocampal and entorhinal cells // Neuron. 2021. S0896-6273(21)00866-7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.036

Fuentealba L.C., Obernier K., Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. № 6. P. 698–708.

Fuentealba L.C., Rompani S.B., Parraguez J.I. et al. Embryonic origin of postnatal neural stem cells // Cell. 2015. V. 161. № 7. P. 1644–1655.

Furutachi S., Matsumoto A., Nakayama K.I. et al. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neu rogenesis // EMBO J. 2013. V. 32. P. 970–981.

Goldman D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration // Nat. Rev. Neurosci. 2014. V. 15. № 7. P. 431–442.

Gómez-Gaviro M.V., Scott C.E., Sesay A.K. et al. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 1317–1322.

Gonçalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. Adult neurogenesis in the hippocampus: From stem cells to behavior // Cell. 2016. V. 167. № 4. P. 897–914.

Götz M., Nakafuku M., Petrik D. Neurogenesis in the developing and adult brain-similarities and key differences // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2016. V. 8. № 7. P. a018853.

Gouti M., Metzis V., Briscoe J. The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches // Trends. Genet. 2015. V. 31. № 6. P. 282–289.

Grande A., Sumiyoshi K., López-Juárez A. et al. Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2373.

Gross C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma // Nat. Rev. Neurosci. 2000. V. 1. № 1. P. 67–73.

Han J., Calvo C.F., Kang T.H. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 controls neural stem cell activation in mice and humans // Cell Rep. 2015. V. 10. № 7. P. 1158–1172.

Haubst N., Berger J., Radjendirane V. et al. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development // Development. 2004. V. 131. № 24. P. 6131–6140.

Höglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease // Nat. Neurosci. 2004. V. 7. P. 726.

Ibrayeva A., Bay M., Pu E. et al. Early stem cell aging in the mature brain // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 5. P. 955–966. e7.

Jang M.H., Bonaguidi M.A., Kitabatake Y. et al. Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. P. 215–223.

Jurkowski M.P., Bettio L., K Woo E. et al. Beyond the hippocampus and the SVZ: adult neurogenesis throughout the brain // Front. Cell Neurosci. 2020. V. 14. № 576444.

Kalamakis G., Brüne D., Ravichandran S. et al. Quiescence modulates stem cell maintenance and regenerative capacity in the aging brain // Cell. 2019. V. 176. № 6. P. 1407–1419.

Katsimpardi L., Litterman N.K., Schein P.A. et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors // Science. 2014. V. 344. P. 630–634.

Kawai H., Kawaguchi D., Kuebrich B.D. et al. Area-specific regulation of quiescent neu ral stem cells by Notch3 in the adult mouse subependymal zone // J. Neurosci. 2017. V. 37. P. 11867–11880.

Kempermann G., Song H., Gage F.H. Neurogenesis in the adult hippocampus // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7. № 9. P. a018812.

Kippin T.E., Kapur S., Van Der Kooy D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 5815–5823.

Kjell J., Fischer-Sternjak J., Thompson A.J. et al. Defining the adult neural stem cell niche proteome identifies key regulators of adult neurogenesis // Cell Stem Cell. 2020. V. 26. № 2. P. 277–293.

Klempin F., Beis D., Mosienko V. et al. Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // J. Neurosci. 2013. V. 33. № 19. P. 8270–8275.

Kohl Z., Ben Abdallah N., Vogelgsang J. et al. Severely impaired hippocampal neurogenesis associates with an early serotonergic deficit in a BAC alpha-synuclein transgenic rat model of Parkinson's disease // Neurobiol. Dis. 2016. V. 85. P. 206–217.

Kokovay E., Goderie S., Wang Y. et al. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 2. P. 163–173.

Kondabolu S., Adsumelli R., Schabel J. et al. Evaluation of prostaglandin D2 as a CSF leak marker: implications in safe epidural anesthesia // Local Reg. Anesth. 2011. V. 4. P. 21–24.

Leeman D.S., Hebestreit K., Ruetz T. et al. Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging // Science. 2018. V. 359. № 6381. P. 1277–1283.

Lehtinen M.K., Zappaterra M.W., Chen X. et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells // Neuron. 2011. V. 69. № 5. P. 893–905.

Lennington J.B., Pope S., Goodheart A.E. et al. Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone // J. Neurosci. 2011. V. 31. P. 13078–13087.

Li W.L., Chu M.W., Wu A. et al. Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement // Elife. 2018. V. 7. № e33006.

Lie D.C., Colamarino S.A., Song H.J. et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis // Nature. 2005. V. 437. P. 1370–1375.

Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M. et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis // Neuron. 2000. V. 28. P. 713–726.

Lledo P.M., Alonso M., Grubb M.S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits // Nat. Rev. Neurosci. 2006. V. 7. P. 179–193.

Llorens-Bobadilla E., Zhao S., Baser A. et al. Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury // Cell Stem Cell. 2015. V. 17. № 3. P. 329–340.

López-Juárez A., Howard J., Ullom K. et al. Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone // Genes Dev. 2013. V. 27. № 11. P. 1272–1287.

Lugert S., Vogt M., Tchorz J.S. et al. Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1 (high) intermediate progenitors // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 670.

Maden M., Manwell L.A., Ormerod B.K. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon // Neural Dev. 2013. V. 8. № 1. https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-1

Magnusson J.P., Zamboni M., Santopolo G. et al. Activation of a neural stem cell transcriptional program in parenchymal astrocytes // eLife. 2020. V. 9. P. e59733.

Mall M., Wernig M. The novel tool of cell reprogramming for applications in molecular medicin // J. Mol. Med. (Berlin, Germany). 2017. V. 95. № 7. P. 695–703.

Marqués-Torrejón M.A., Porlan E., Banito A. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. P. 88–100.

Marqués-Torrejón M.Á., Williams C.A.C., Southgate B. et al. LRIG1 is a gatekeeper to exit from quiescence in adult neural stem cells // Nat. Commun. 2021. V. 12. № 1. P. 2594.

Mercier F., Douet V. Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone // J. Chem. Neuroanat. 2014. V. 57–58. P. 54–61.

Merkle F.T., Fuentealba L.C., Sanders T.A. et al. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types // Nat. Neurosci. 2014. V. 17. № 2. P. 207–214.

Merkle F.T., Mirzadeh Z. Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain // Science. 2007. V. 317. P. 381–384.

Mich J.K., Signer R.A.J., Nakada D. et al. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain // eLife. 2014. V. 3. P. e02669.

Mira H., Andreu Z., Suh H. et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 1. P. 78–89.

Mokalled M.H., Patra C., Dickson A.L. et al. Injury-induced ctgfa directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish // Science. 2016. V. 354. № 6312. P. 630–634.

Mukherjee S., Brulet R., Zhang L. et al. REST regulation of gene networks in adult neural stem cells // Nat. Commun. 2016. V. 7. № 13360.

Nagoshi N., Khazaei M., Ahlfors J.E. et al. Human spinal oligodendrogenic neural progenitor cells promote functional recovery after spinal cord injury by axonal remyelination and tissue sparing // Stem Cells Transl. Med. 2018. V. 7. № 11. P. 806–818.

Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A. et al. Intra-arterial stem cell transplantation in experimental stroke in rats: Real-Time MR visualization of transplanted cells starting with their first pass through the brain with regard to the therapeutic action // Front. Neurosci. 2021. V. 15. № 641970.

Nato G., Caramello A., Trova S. et al. Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington's disease // Development. 2015. V. 142. P. 840–845.

Nieto-Estevez V., Oueslati-Morales C.O., Li L. et al. Brain insulin-like growth factor-I directs the transition from stem cells to mature neurons during postnatal/adult hippocampal neurogenesis // Stem Cells. 2016. V. 34. № 8. P. 2194–2209.

Ninkovic J., Steiner-Mezzadri A., Jawerka M. et al. The BAF complex interacts with Pax6 in adult neural progenitors to establish a neurogenic cross-regulatory transcriptional network // Cell Stem Cell. 2013. V. 13. № 4. P. 404–408.

Nori S., Khazaei M., Ahuja C.S. et al. Human oligodendrogenic neural progenitor cells delivered with chondroitinase ABC facilitate functional repair of chronic spinal cord injury // Stem Cell Reports. 2018. V. 11. № 6. P. 1433–1448.

Obernier K., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain // Development. 2019. V. 146. № 4. P. 156059.

Okamoto M., Inoue K., Iwamura H. et al. Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis // FASEB J. 2011. V. 25 № 10. P. 3570–3582.

Ong J., Plane J.M., Parent J.M. et al. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat // Pediatr. Res. 2005. V. 58. № 3. P. 600–606.

Otsuki L., Brand A.H. Cell cycle heterogeneity directs the timing of neural stem cell activation from quiescence // Science. 2018. V. 360. № 6384. P. 99–102.

Ottone C., Krusche B., Whitby A. et al. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells // Nat. Cell Biol. 2014. V. 16. P. 1045–1056.

Paez-Gonzalez P., Abdi K., Luciano D. et al. Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons // Neuron. 2011. V. 71. № 1. P. 61–75.

Paez-Gonzalez P., Asrican B., Rodriguez E. et al. Identification of distinct ChAT$^+$ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis // Nat. Neurosci. 2014. V. 17. P. 934–942.

Pastrana E., Cheng L.-C., Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 6387–6392.

Paul A., Chaker Z., Doetsch F. Hypothalamic regulation of regionally distinct adult neural stem cells and neurogenesis // Science. 2017. V. 356. № 6345. P. 1383–1386.

Pilz G.A., Bottes S., Betizeau M. et al. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus // Science. 2018. V. 359. № 6376. P. 658–662.

Pineda J.R., Daynac M., Chicheportiche A. et al. Vascular-derived TGF-β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain // EMBO Mol. Med. 2013. V. 5. № 4. P. 548–562.

Ponti G., Obernier K., Alvarez-buylla A. et al. Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone // Cell Cycle. 2017. V. 12. № 11. P. 1649–1650.

Porcheri C., Suter U., Jessberger S. Dissecting integrin-dependent regulation of neural stem cell proliferation in the adult brain // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 5222–5232.

Qian H., Kang X., Hu J. et al. Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons // Nature. 2020. V. 582(7813). P. 550–556.

Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // Science. 1992. V. 255. № 5052. P. 1707–1710.

Ruddy R.M., Morshead C.M. Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury // Cell Tissue Res. 2018. V. 371. № 1. P. 125–141.

Sailor K.A., Valley M.T., Wiechert M.T. et al. Persistent structural plasticity optimizes sensory information processing in the olfactory bulb // Neuron. 2016. V. 91. P. 384–396.

Salvi R., Steigleder T., Schlachetzki J.C. et al. Distinct effects of chronic dopaminergic stimulation on hippocampal neurogenesis and striatal doublecortin expression in adult mice // Front.Neurosci. 2016. V. 10. P. 77.

Samoilova E.M., Belopasov V.V., Baklaushev V.P. Transcription factors of direct neuronal reprogramming in ontogenesis and *ex vivo* // Mol. Biol. (Moscow). 2021. V. 55. № 5. P. 707–733.

Samoilova E.M., Belopasov V.V., Ekusheva E.V. et al. Epigenetic clock and circadian rhythms in stem cell aging and rejuvenation // J. Pers. Med. 2021. V. 11. № 1050.

Samoylova E.M., Baklaushev V.P. Cell reprogramming preserving epigenetic age: advantages and limitations // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 9. P. 1035–1047.

Sato K., Malchinkhuu E., Horiuchi Y. et al. HDL-like lipoproteins in cerebrospinal fluid affect neural cell activity through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 359. № 3. P. 649–654.

Schaffner I., Minakaki G., Khan M.A. et al. FoxO function is essential for maintenance of autophagic flux and neuronal morphogenesis in adult neurogenesis // Neuron. 2018. V. 99. P. 1188–1203. e6.

Seib D.R., Corsini N.S., Ellwanger K. et al. Loss of Dickkopf-1 restores neu rogenesis in old age and counteracts cognitive decline // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. P. 204–214.

Shen Q., Wang Y., Kokovay E. et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. P. 289–300.

Sheng C., Jungverdorben J., Wiethoff H. et al. A stably self-renewing adult blood-derived induced neural stem cell exhibiting patternability and epigenetic rejuvenation // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1. P. 4047.

Shingo T., Gregg C., Enwere E. et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin // Science. 2003. V. 299. P. 117–120.

Silva-Vargas V., Maldonado-Soto A.R., Mizrak D. et al. Age-dependent niche signals from the choroid plexus regulate adult neural stem cells // Cell Stem Cell. 2016. V. 19. № 5. P. 643–652.

Smith L.K., He Y., Park J.S. et al. β2-Microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis // Nat. Med. 2015. V. 21. P. 932–937.

Snyder J.S., Soumier A., Brewer M. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior // Nature. 2011. V. 476. № 7361. P. 458–461.

Sohn J., Orosco L., Guo F. et al. The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice // J. Neurosci. 2015. V. 35. № 9. P. 3756–3763.

Song J., Zhong C., Bonaguidi M.A. et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision // Nature. 2012. V. 489. P. 150–154.

Song M., Yu S.P., Mohamad O. et al. Optogenetic stimulation of glutamatergic neuronal activity in the striatum enhances neurogenesis in the subventricular zone of normal and stroke mice // Neurobiol. Dis. 2017. V. 98. P. 9–24.

Sorrells S.F., Paredes M.F., Cebrian-Silla A. et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults // Nature. 2018. V. 555. № 7696. P. 377–381.

Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1219–1227.

Storer M.A., Gallagher D., Fatt M.P. et al. Interleukin-6 regulates adult neural stem cell numbers during normal and abnormal post-natal development // Stem Cell Reports. 2018. V. 10. P. 1464–1480.

Suetsugu-Maki R., Maki N., Nakamura K. et al. Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity // BMC Biol. 2012. V. 10. № 103.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.

Tanabe K., Ang C.E., Chanda S. et al. Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons // Proc. Natl. Acad. of Sci. U. S. A. 2018. V. 115. № 25. P. 6470–6475.

Tavazoie M., Van Der Veken L., Silva-Vargas V. et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. P. 279–288.

Taverna E., Götz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis: Toward an understanding of the development and evolution of the neocortex // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 465–502.

Toda T., Parylak S.L., Linker S.B. et al. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease // Mol. Psychiatry. 2019. V. 24. № 1. P. 67–87.

Tong C.K., Chen J., Cebrián-Silla A. et al. Axonal control of the adult neural stem cell niche // Cell Stem Cell. 2014a. V. 14. P. 500–511.

Torper O., Pfisterer U., Wolf D.A. et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. № 17. P. 7038–7043.

Urbán N., Blomfield I.M., Guillemot F. Quiescence of adult mammalian neural stem cells: a highly regulated rest // Neuron. 2019. V. 104. № 5. P. 834–848.

Urbán N., van den Berg D.L., Forget A. et al. Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein // Science. 2016. V. 353. № 6296. P. 292–295.

Victor M.B., Richner M., Olsen H.E. et al. Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes // Nat. Neurosci. 2018. V. 21. № 3. P. 341–352.

Villeda S.A., Plambeck K.E., Middeldorp J. et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice // Nat. Med. 2014. V. 20. № 6. P. 659–663.

Vonderwalde I., Azimi A., Rolvink G. et al. Transplantation of directly reprogrammed human neural precursor cells following stroke promotes synaptogenesis and functional recovery // Transl. Stroke Res. 2019. V. 11. № 1. P. 93–107.

Yuzwa S.A., Borrett M.J., Innes B.T. et al. Developmental emergence of adult neural stem cells as revealed by single-cell transcriptional profiling // Cell Rep. 2017. V. 21. № 13. P. 3970–3986.

Zappaterra M.W., Lehtinen M.K. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond // CMLS. 2012. V. 69. № 17. P. 2863–2878.

Zhang D., Wang X., Lu X.Y. Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice // Endocrinology. 2016. V. 157. № 7. P. 2853–2869.

Zhang R., Boareto M., Engler A. et al. Id4 downstream of Notch2 maintains neural stem cell quiescence in the adult hippocampus // Cell Rep. 2019. V. 28. P. 1485–1498. e6.

Zhao C., Sun G., Li S. et al. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate deter mination // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 365–371.

Zhou Y., Bond A.M., Shade J.E. et al. Autocrine Mfge8 signaling prevents developmental exhaustion of the adult neural stem cell pool // Cell Stem Cell. 2018. V. 23. № 3. P. 444–452. e4.

Resident Neural Stem Cell Niches and Regeneration: The Shine and Poverty of Adult Neurogenesis

V. P. Baklaushev[1, 2, *], G. M. Yusubalieva[1], E. M. Samoilova[1, 2], and V. V. Belopasov[3]

[1]Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, FMBA of Russia, Orekhoviy blvd, 28, Moscow, 115682 Russia

[2]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

[3]Astrakhan State Medical University, ul. Bakinskaya 121, Astrakhan, 414000 Russia

**e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru*

The discovery of postnatal neurogenesis, the isolation and cultivation of neural stem cells (NSCs) of the adult brain and the subsequent production of autologous neurons from them *in vitro* have filled scientists with the hope that new regenerative technologies will soon be created in order to restore the central nervous system (CNS) functions lost due to diseases and injuries. However, over the next thirty years, the excitement and charm of the new discovery gave way to understanding the functions of NSC and their critical assessment. Why did nature make it so that cellular regeneration in mammals was preserved only in the olfactory bulb, and not in the retina and organ of Corti, despite the fact that sight and hearing are no less important for the survival of mammalian species than smell? Why is cellular regeneration present in the ancient cortex, but absent in the neocortex? Why are there niches of resident stem cells in the brain, but absent in the spinal cord? Finding answers to these questions is forcing scientists to rethink the biological role of adult NSCs. Clonal studies of derivatives of adult NSCs allow us to conclude that their functions in the adult brain are most likely not associated with reparative regeneration and are definitely not associated with epimorphic regeneration of CNS structures. Young neurons formed in the subventricular and subgranular zones of the adult brain, integrating into neural networks, perform very specific functions – modulation of smell recognition and the functioning of learning and memory, respectively. In an adult, the level of neurogenesis in the subventricular zone is vanishingly small, and the level of neurogenesis in the dentate gyrus is comparable to the level in mice at least in the postnatal period. It allows us to conclude that the function of neurogenesis in higher primates is reduced to participation in cognitive plasticity, memory modulation and other functions of the hippocampus. Under pathological conditions, global changes in homeostasis occur in the stem niches of the adult brain, accompanied by activation of dormant NSCs, increased proliferation of surviving NSCs and all subsequent clones of progenitors. However, in the case of severe cell death, an epiform regeneration with the participation of newly formed neuroblasts does not even occur in lower mammals. In humans, taking into account the pronounced age-related involution of neurogenesis in the dentate gyrus, the restoration of cerebral functions is carried out only through neuronal plasticity. Understanding the biological role of adult NSCs allows us to draw a disappointing conclusion that the creation of regenerative technologies for diseases and injuries of the CNS in humans, if possible, is possible only by adult cells reprogramming and giving them and their microenvironment the properties of juvenile nervous tissue.

Keywords: neurogenesis, neural stem cells, stem cell niches, subventricular zone, subgranular zone, CNS regeneration

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 196–202

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 577.25:577.218

АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ *insrr*

© 2022 г. Е. А. Ганцова[a], *, И. Е. Деев[a], А. Г. Петренко[a], О. В. Серова[a]

[a] *Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия*

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

Поступила в редакцию 16.11.2021 г.
После доработки 13.01.2022 г.
Принята к публикации 18.01.2022 г.

Поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия организма играет ключевую роль в регуляции метаболизма, и обеспечивается функционированием эндогенных pH-сенсоров – молекул, активность которых регулируется при изменении pH среды. Рецепторная тирозинкиназа IRR (рецептор, подобный рецептору инсулина) является сенсором щелочного pH, активируется при повышении pH внеклеточной среды выше 7.9. Экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некоторых органах, в определенных типах клеток. Установлено, что рецептор IRR вовлечен в экскрецию бикарбоната почками. Механизм действия и функция рецептора IRR как сенсора щелочного pH в других органах не известна. Для выявления роли рецептора IRR в эмбриогенезе мы провели эксперименты по оценке развития преимплантационных эмбрионов мышей дикого типа и мышей, нокаутных по гену *insrr*, с использованием MEA-теста (mouse embryo assay). Оценку развития осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процент образования бластоцист от общего количества извлеченных зигот. Выход бластоцист у нокаутных животных оказался значительно ниже, чем у животных дикого типа, 6.7% от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 43.8% у животных дикого типа. Отличалось и количество извлеченных зигот у мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*. В среднем, количество извлеченных зигот из одной самки составило 18.9 зигот для мышей дикого типа, и 11.8 зигот для нокаутных по *insrr* мышей. Полученные нами результаты указывают на потенциальную роль рецепторной тирозинкиназы IRR в развитии преимплантационных эмбрионов.

Ключевые слова: рецепторные тирозинкиназы, преипмлантационные эмбрионы, IRR, Mouse Embryo Assay

DOI: 10.31857/S047514502203003X

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших свойств живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия и ионного состава внутренней среды, необходимого для жизнедеятельности клеток в условиях влияния внешних и внутренних факторов. Регуляция кислот и оснований обеспечивается множеством молекулярных механизмов, многие из которых до сих пор не изучены. В организме существует большое количество эндогенных pH-сенсоров – молекул, свойства и активность которых регулируется при изменении pH среды (Serova et al., 2020). Одним из сенсоров щелочного pH является рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), член семейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина (IR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) (Deyev et al., 2011). IRR может напрямую активироваться слабощелочной внеклеточной средой, что разительно отличает рецептор от других рецепторных тирозинкиназ, которые имеют лиганды белковой или пептидной природы.

В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некоторых органах, в определенных типах клеток. Наибольшее количество IRR было обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β-вставочных клетках, выстилающих дистальные канальцы (Petrenko et al., 2013), которые секретируют бикарбонат. В меньших концентрациях мРНК IRR была обнаружена в мозге, желудке, поджелудочной железе (Petrenko et al., 2013; Deyev et al., 2017). С использованием метода РНК-секвенирования отдельных клеток была показана экспрессия IRR в нейронах спинномозговых ганглиев мышей (Usoskin et al., 2015).

Установлено, что IRR вовлечен в секрецию бикарбоната почками. У мышей, нокаутных по гену *insrr*, кодирующему рецептор IRR, щелочная нагрузка на организм сопровождалась метаболическим алкалозом и пониженной секрецией бикарбоната в мочу (Deyev et al., 2011). Механизм действия и функция рецептора IRR как сенсора щелочного pH в других органах не установлена. По данным литературы, рецепторная тирозинкиназа IRR связана с репродуктивной системой и ранним эмбриональным развитием. У крыс наблюдается активация экспрессии IRR в текальных клетках фолликулов перед овуляцией при стимуляции гонадотропином. После овуляции экспрессия IRR не обнаруживается (Dissen et. al., 2006). Известно, что IRR экспрессируется в большом количестве на эмбриональных стадиях развития мыши в ганглиях тройничного, языкоглоточного и спинномозгового нервов и поджелудочной железе, в меньшем количестве в почечных канальцах (Diez-Roux et al., 2011). На роль рецептора IRR в эмбриогенезе указывает экспрессия IRR, а также других членов семейства IR и IGF-IR, на стадии одноклеточных эмбрионов мыши и бластоцистах (Erickson, Strnatka, 2011; Brusentsev et al., 2021). Было показано, что функционирование всех трех рецепторов семейства IR (IR, IGF-IR, IRR) необходимо для формирования семенников во время эмбриогенеза у мышей. У мышей с тройным нокаутом генов семейства рецептора инсулина наблюдается смена пола эмбрионов от самца к самке, характеризующаяся пониженной экспрессией локусов *sry*, *sox9*, которые определяют развитие мужского пола (Nef et al., 2003).

Целью работы является изучение влияния нокаута гена *insrr*, кодирующего рецепторную тирозинкиназу IRR, на развитие преимплантационных эмбрионов мыши *in vitro*. В данной работе мы провели эксперименты по оценке развития преимплантационных эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr* с использованием MEA-теста (mouse embryo assay). Параметром для оценки развития является выход бластоцист – процент образования бластоцист от общего числа выделенных зигот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание и разведение лабораторных животных. Для поддержания генетического фона и минимизации эффекта накопления мутаций, был использован метод разведения однопометных мышей. Мыши с нокаутом гена *insrr*–/– были получены ранее на основе линии мышей C57Bl/6J (Kitamura et al., 2001). Затем, в питомнике лабораторных животных в филиале ИБХ в Пущино путем скрещивания нокаутных мышей *insrr*–/– и диких мышей линии C57Bl/6J была получена линия гетерозиготных мышей *insrr*+/– со статусом без специфических патогенов (SPF). При скрещивании гетерозигот получали мышей потомков одного поколения – гомозиготный дикий тип, гетерозиготы и гомозиготный нокаутный тип. Генотип полученного при скрещивании потомства определяли при помощи ПЦР с геномной ДНК, выделенной из ушей и хвостов мышей. Дикую аллель детектировали, используя праймеры mwt1 (5'-GCAAGCTACACAGGCTCGAGGG-3') и mwt2 (5'-TGGGTTCTGATCCTCTCAAGGAG-3'). Для выявления нокаутной аллели использовали праймеры ko1 (5'-CAAAACCAAATTAAGGGC-CAGCTC-3') и ko2 (5'-AGCCTGAAGACCCTC-GTCGACT-3'). Был определен генотип у 94 мышей с целью выявления необходимых для работы животных. Из них было 26 мышей гомозиготного дикого типа, 27 мышей гомозиготного нокаутного типа и 41 мышь гетерозиготного типа. Самок гомозиготных мышей использовали для сравнительного анализа.

Лабораторные животные содержались в виварии ИБХ РАН, со свободным доступом к еде и питью, соотношение светлого и темного времени суток 1 : 1 (12 ч). В экспериментах использовали мышей потомков одного поколения дикого типа и нокаутных по гену *insrr*. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных, утвержденным Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Анализ развития преимплантационных эмбрионов. В качестве метода оценки развития преимплантационных эмбрионов использовали MEA-тест. У самок мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr* в возрасте 2–3 мес. стимулировали суперовуляцию (Luo et al., 2011). Для стимуляции суперовуляции самкам мышей внутримышечно вводили поочередно гормональные препараты. Первая инъекция 5 МЕ гонадотропного гормона сыворотки крови жеребых кобыл (ГСЖК) (препарат “Фоллимаг”, ЗАО “Мосагроген”, Россия), через 48 ч, 5 МЕ гормона ХГЧ (препарат “Хорионический гонадотропин”, ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия). Сразу после второй инъекции самок подсаживали на ночь к самцам, на следующее утро по копулятивной пробке определяли успешно спарившихся самок, которых отбирали в эксперимент. Животных усыпляли с помощью анестезирующих препаратов, золетил 15 мг/кг, ксилазин 5 мг/кг в 0.9% растворе NaCl. Затем умерщвляли методом цервикальной дислокации.

У самок мышей извлекали яйцевод и вскрывали ампулы яйцевода в среде ЭКО1 “Ооклин” (ООО НПП “ПанЭко”, Россия) в которой собирали ооцит-кумулюсные комплексы. Данные комплек-

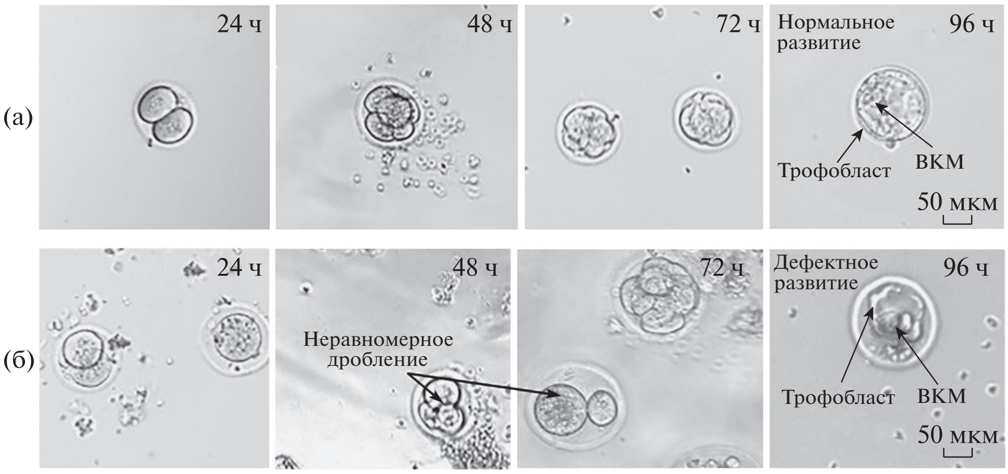

Рис. 1. Анализ развития преимплантационных эмбрионов мыши: панель изображений преимплантационных эмбрионов через 24, 48, 72, 96 ч после извлечения зигот. (а) – эмбрионы мышей дикого типа, (б) – эмбрионы мышей, нокаутных по гену *insrr*. Стрелками обозначены трофобласт и ВКМ – внутриклеточная масса; для нокаутных преимплантационных эмбрионов показаны отклонения от нормального развития – неравномерное дробление.

сы обрабатывали ферментативной средой ЭКО1 "Гиаза" (ООО НПП "ПанЭко", Россия) и продолжали отмывку ооцитов в среде ЭКО1 "Ооклин". Очищенные от клеток кумулюса ооциты помещали в каплю среды ЭКО ПРО "Дробление" (ООО НПП "ПанЭко", Россия), покрытую жидким парафиновым маслом. Эмбрионы культивировали в инкубаторе при условиях 5% CO_2 и температуре 37°C. Деление эмбрионов анализировали каждые сутки в течение 96 часов после извлечения зигот с использованием микроскопа. Оценку развития осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процента образования бластоцист из общего количества извлеченных эмбрионов. МЕА тест проводили в трех повторах для каждого генотипа.

Статистическая обработка данных экспериментов. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Software, USA). Данные, полученные для животных двух генотипов, соответствовали критерию нормальной выборки (критерий Шапиро–Уилка). Поэтому для расчета статистической значимости двух выборок использовали t-критерий Стьюдента, результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления роли нокаута гена рецептора IRR в раннем эмбриональном развитии был проведен анализ развития эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, с использованием МЕА-теста. В эксперименте были использованы 12 самок дикого типа и 10 самок, нокаутных по гену *insrr*, потомков одного поколения. У самок мышей в возрасте 2–3 мес. стимулировали суперовуляцию. После подсадки к самцам у самок извлекали яйцеводы, выделяя из них зиготы. Деление эмбрионов анализировали каждые сутки в течение 96 часов после извлечения с использованием микроскопа (рис. 1). Анализируя развитие эмбрионов дикого типа, мы наблюдали типичное деление бластомеров, спустя 24 ч образовывались двухклеточные эмбрионы, спустя 48 ч – четырехклеточные и т.д. Бластоцисты у животных дикого типа имели типичное строение, выраженный трофобласт и внутриклеточную массу, все проходили вылупление (рис. 1а). Для зигот, извлеченных из мышей, нокаутных по гену *insrr*, наблюдалась задержка в развитии, а также неравномерное дробление бластомеров (см. рис. 1б, 48 и 72 ч). Эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты имели аномальное строение, внутриклеточная масса и трофобласт были неявно выражены, вылупление из оболочки происходило не во всех случаях. Оценку развития эмбрионов осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процента образования бластоцист из общего количества извлеченных зигот.

Результаты этих экспериментов показали, что выход бластоцист у нокаутных по гену *insrr* животных значительно ниже, чем у животных дикого типа, 6.7% от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 43.8% у животных дикого типа (t-тест, $p < 0.05$) (рис. 2а). Отличалось и количество извлеченных зигот у мышей дикого типа и нокаутных по *insrr* – 231 клетка из 12 самок, и 119 клеток из 10 самок, соответственно (табл. 1). В среднем количества извлеченных зигот из одной самки составили 18.9 зигот для мышей дикого типа, и 11.8 зигот для нокаутных по *insrr* мышей (рис. 2б). Процент развития эмбрионов (количество дробящихся зигот) у нокаутных жи-

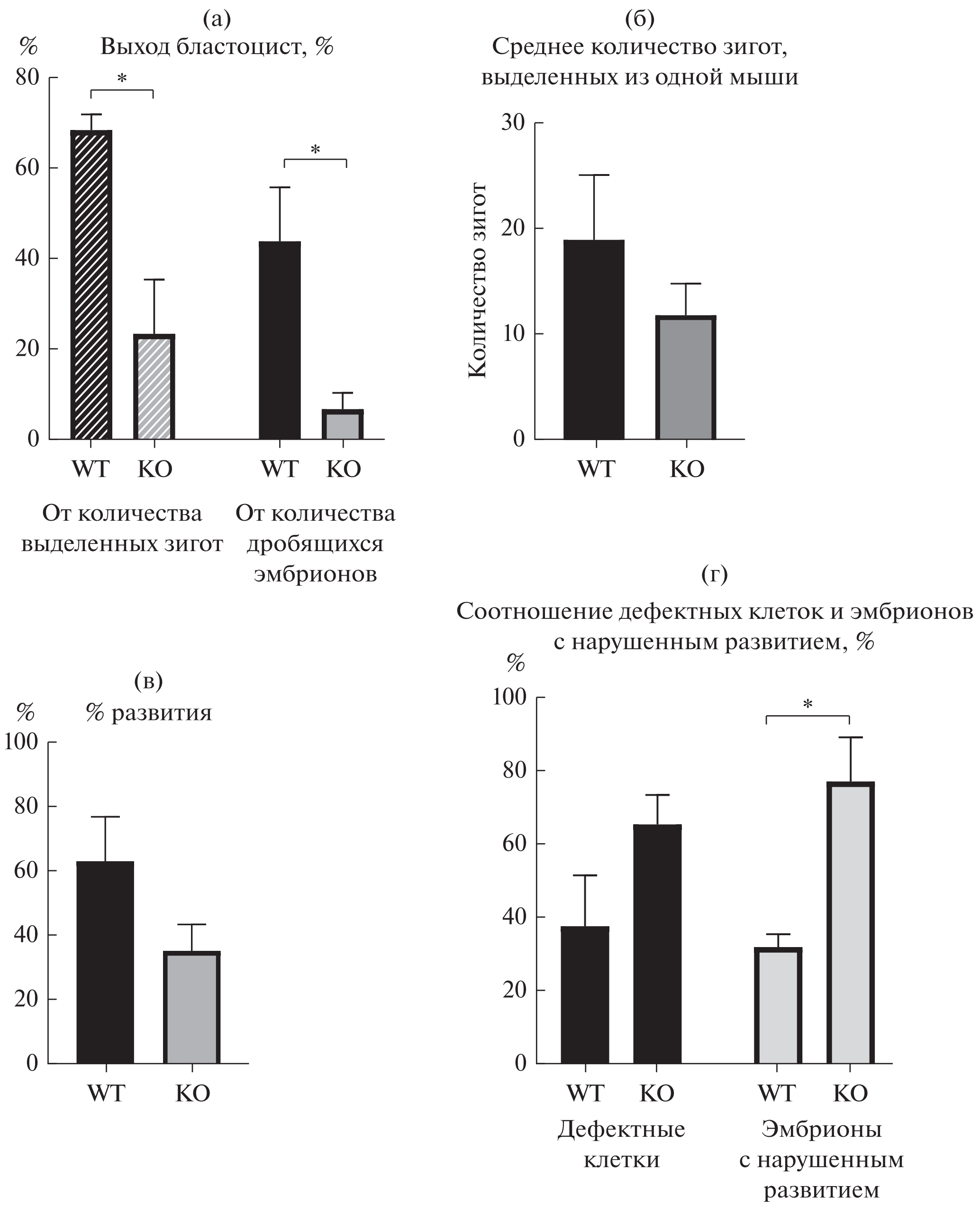

Рис. 2. Результаты MEA теста. (а) – Гистограмма выхода бластоцист от количества выделенных зигот и от количества дробящихся эмбрионов, в процентном соотношении (* $p < 0.05$); (б) – гистограмма среднего количества зигот, выделенных из одной самки мыши; (в) – % развития, количество дробящихся зигот, в процентном соотношении от общего количества выделенных зигот; (г) – гистограмма процентного соотношения дефектных клеток и эмбрионов с нарушенным развитием. Черным цветом указано количество дефектных клеток, в которых наблюдались множественные вакуоли, гранулы, деформация цитоплазмы. Серым – эмбрионы с нарушенным развитием (неравномерное дробление бластомеров, остановка развития на различных стадиях) (* $p < 0.05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

вотных также был ниже – 34.9%, тогда как у мышей дикого типа – 62.7% (рис. 2в). Если рассчитывать выход бластоцист от количества двухклеточных эмбрионов, то он составил 68.4 и 23.3% для мышей дикого типа и нокаутных по *insrr* соответственно (рис. 2а).

Если суммировать данные трех экспериментов для каждого генотипа (табл. 1), то у животных дикого типа четырехклеточные эмбрионы образовались в количестве 108 из 124 дробящихся клеток, морулы в количестве 96 шт. Для нокаутных по IRR животных образовалось 30 четырехклеточ-

Таблица 1. Суммарные данные МЕА-теста, полученные в результате трех экспериментов, для мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену *insrr* (KO)

	WT	KO
Количество мышей	12	10
Количество извлеченных зигот	231	119
Количество двухклеточных эмбрионов	124	38
Количество четырехклеточных эмбрионов	108	30
Количество морул	96	22
Количество бластоцист	83	10

ных эмбрионов из 38 двухклеточных, количество морул – 22 шт. У нокаутных животных наблюдалось большее количество дефектных зигот в процентном соотношении от общего количества выделенных клеток (рис. 2г). Дефектными считали клетки, в которых наблюдались множественные вакуоли, гранулы, деформация цитоплазмы. Нарушенное развитие, а именно, неравномерное дробление, остановка развития на различных стадиях, чаще наблюдались у нокаутных эмбрионов (рис. 2г). Качество бластоцист также различалось: Bl2Bb/Bl2Bc/Bl2Cc в нокаутных эмбрионах, и Bl4Ab/Bl4Aa в эмбрионах дикого типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами были впервые проведены эксперименты по оценке развития преимплантационных эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr* с использованием МЕА-теста (mouse embryo assay). В условиях МЕА-теста мы наблюдали у нокаутных животных более низкий процент развития (количество дробящихся клеток от общего числа извлеченных зигот) и более низкие значения выхода бластоцист, в том числе от количества двухклеточных эмбрионов, чем у животных дикого типа (рис. 2а). В контроле дикого типа мы наблюдали невысокий выход бластоцист 68.4% от количества дробящихся клеток. Это можно объяснить тем, что эксперимент проводился на линии мышей C57Bl/6J, тогда как протокол МЕА-теста предполагает использование линии CBA, либо гибридов первого поколения C57Bl/6J-CBA. Большее количество извлеченных зигот у мышей дикого типа по сравнению с мышами, нокаутными по гену *insrr* (18.9 и 11.8 зигот в среднем из одного животного, соответственно) может быть связано с активацией экспрессии рецептора IRR в яичниках мышей дикого типа под действием гонадотропина и указывает на потенциальную роль рецептора IRR в процессах овуляции. Наблюдаемый эффект может быть связан с активностью IRR как сенсора щелочного pH на преимплантационных стадиях развития или низким качеством исходных зигот ввиду его активности на более ранних этапах – в оогенезе.

Ионный состав и pH жидкой среды в половых путях самок имеет большое физиологическое значение для ряда репродуктивных событий, включая транспорт спермы, оплодотворение, транспорт эмбрионов, развитие и имплантацию бластоцист (Liu et al., 2012). Известно, что маточные жидкости содержат в два-четыре раза больше ионов бикарбоната, чем плазма крови. При этом во время эструса значение pH маточной жидкости достигает значения больше 8 (щелочная среда), в то время как при диэструсе значение pH среды понижается и становится близким к нейтральному (He et al., 2010). Повышение pH маточной жидкости во время эструса связано с увеличением экспрессии ряда белков, участвующих в регуляции ионов бикарбоната, в том числе Cl^-/HCO_3^- обменника SLC26A6 (He et al., 2010).

Поддержание кислотно-щелочного баланса в клетках преимплантационных эмбрионов также играет важную роль. Так, например, была показана высокая экспрессия Cl^-/HCO_3^- обменников SLC4A2, SLC4A42 на стадиях преимплантационного эмбрионального развития мышей. Данные обменники регулируют внутриклеточный pH, обеспечивая механизм защиты клеток от алкалоза. Активность Cl^-/HCO_3^- обменников снижается в ходе развития, активность на стадиях морулы и бластоцисты значительно ниже по сравнению с одно- и двухклеточной стадиями. Таким образом преимплантационные эмбрионы адаптируются к окружающей среде при переходе от щелочной среды яйцевода в среду матки с более низкими значениями pH (Dagilgan et al., 2015).

Ранее нами было показано (Deyev et al., 2011), что нокаут гена *insrr* приводит к снижению экспрессии Cl^-/HCO_3^- обменника SLC26A4. Ионообменник пендрин (SLC26A) локализуется β-вставочных клетках почечных канальцев, которые участвуют в экскреции ионов бикарбоната почками. Можно предположить, что pH-чувствительный рецептор IRR, активируясь в ответ на повышение pH внеклеточной среды, может запускать сигнальные каскады в клетке, которые приводят к изменению экспрессии и/или активности ионных каналов, непосредственно участвующих в регуляции концентрации кислот и оснований, в частности ионов HCO_3^-. Ионы HCO_3^-, как известно, играют критически важную роль в процессах, связанных с размножением у млекопитающих, при этом нарушение кислотно-основного гомеостаза в репродуктивной системе часто вызывает бесплодие/субфертильность у млекопитающих (Liu et al., 2012).

Полученные нами результаты, а также ранее опубликованные данные указывают на потенциальную роль рецепторной тирозинкиназы IRR в развитии преимплантационных эмбрионов посредством неизвестных на данный момент молекулярных механизмов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19-04-01042, 19-34-90177, 19-04-00815.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств проводили в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee), утвержденным Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы О.В. Серова, А.Г. Петренко придумали и разработали дизайн эксперимента. Автор О.В. Серова проводила генотипирование мышей. Автор Е.А. Ганцова выделяла преимплантационные эмбрионы, проводила их культивирование *in vitro*. Авторы О.В. Серова, Е.А. Ганцова проводили анализ развивающихся эмбрионов, подсчет количества образовавшихся бластоцист. Все авторы участвовали в обработке данных и в обсуждении результатов. Авторы И.Е. Деев, О.В. Серова, Е.А. Ганцова участвовали в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Brusentsev E.Yu., Kizilova E.A., Igonina T.N. et al. Effects of Insulin-like Growth Factor 1 on the in vitro development of mouse embryos after cryopreservation // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. P. 120–124.

Danglion S., Dundar-Yenilmez E., Tuli A. et al. Evaluation of intracellular pH regulation and alkalosis defense mechanisms in preimplantation embryos // Theriogenology. 2015. V. 83. P. 1075–1084.

Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P. et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689.

Deyev I.E., Popova N.V., Serova O.V. et al. Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line // Biochimie. 2017. V. 138. P. 62–69.

Diez-Roux G., Banfi S., Sultan M. et al. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo // PLoS Biol. 2011. V. 9. P. e1000582.

Dissen G.A., Garcia-Rudaz C., Tapia V. et al. Expression of the insulin receptor-related receptor (IRR) is induced by the preovulatory surge of LH in thecal-interstitial cells of the rat ovary // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 155–165.

Erickson R.P., Strnatka D. Insulin receptor-related (Irr) is expressed in pre-implantation embryos: a possible relationship to “growth factor Y” and sex determination // Mol. Reprod. Dev. 2011. V. 78. P. 552.

He Q., Chen H., Wong C.H. et al. Regulatory mechanism underlying cyclic changes in mouse uterine bicarbonate secretion: role of estrogen // Reproduction. 2010. V. 140. P. 903–910.

Kitamura T., Kido Y., Nef S. et al. Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. P. 5624–5630.

Liu Y., Wang D.K., Chen L.M. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction // Biol. Reprod. 2012. V. 86. P. 99.

Luo C., Zuniga J., Edison E. et al. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. P. 471–478.

Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J. et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice // Nature. 2003. V. 426. P. 291–295.

Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E. et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance // Biochim Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 2170–2175.

Serova O.V., Gantsova E.A., Deyev I.E. et al. The value of pH sensors in maintaining homeostasis of the nervous system // Russian J. Bioorganic Chemistry. 2020. V. 46. P. 506–519.

Usoskin D., Furlan A., Islam S. et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing // Nat. Neurosci. 2015. V. 18. P. 145–153.

Analysis of Development of *insrr* Knockout Mouse Primplantation Embryos

E. A. Gantsova[1, *], I. E. Deyev[1], A. G. Petrenko[1], and O. V. Serova[1]

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

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

Maintaining the optimal acid-base balance of the organism has a pivotal role in the regulation of metabolism. It is provided by the functioning of endogenous pH-sensors – molecules with abilities to change their activity during the changes in the pH of the medium. Receptor tyrosine kinase IRR (insulin receptor-related receptor) is an alkaline pH sensor that activated when the pH of the extracellular medium rises above 7.9. Expression of IRR is specific; the receptor is found in some organs in certain types of cells. It has been established that IRR is involved in renal excretion of bicarbonate. The mechanism of action and function of the IRR receptor as a sensor for alkaline pH in other organs is vague. To elucidate the role of the IRR receptor in the embryogenesis, we carried out experiments to evaluate the development of preimplantation embryos of wild-type and *insrr* knockout mice using the MEA test (Mouse Embryo Assay). The development was assessed using the blastocyst yield index – the percentage of blastocyst formation from the total number of extracted zygotes. The yield of blastocysts in knockout animals was lower than in wild-type animals, 6.7% of the total number of extracted cells for knockout animals and 43.8% for wild-type animals. The number of extracted zygotes from wild-type and *insrr* knockout mice also differed. The average number of extracted zygotes from one female was 18.9 zygotes for wild-type mice, and 11.8 zygotes for *insrr* knockout mice. Our results reveal a possible role for the receptor tyrosine kinase IRR in the development of preimplantation embryos.

Keywords: receptor tyrosine kinases, preimplantation embryos, IRR, Mouse Embryo Assay

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 203–213

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 595.371:591.16(282.247.211)

ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ ИНВАЗИОННОГО ВИДА *GMELINOIDES FASCIATUS* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) В ОНЕЖСКОМ ОЗЕРЕ

© 2022 г. А. И. Сидорова*

Институт водных проблем Севера Карельского научного центра Российской академии наук, пр. А. Невского, 50, Петрозаводск, 185030 Россия

**e-mail: bolt-nastya@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.
После доработки 24.01.2022 г.
Принята к публикации 16.01.2022 г.

В статье рассмотрены особенности репродуктивной биологии инвазионного вида *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) (Crustacea: Amphipoda), способствующие натурализации в водоемах-реципиентах. Для популяции этого вида, обитающей в Петрозаводской губе Онежского озера характерно преобладание доли самок над долей самцов и образование “гаремов”. Данное явление способствует быстрому нарастанию численности чужеродной амфиподы в новых условиях. Плодовитость рачка варьирует от 3 до 24 яиц на самку. Исследование динамики эмбрионального развития *G. fasciatus* показывает, что в условиях Онежского озера за вегетативный сезон происходят два массовых выхода молоди из яиц. Выявлена размерно-возрастная структура участвующих в размножении самок. Индивидуальная плодовитость самок в течение сезона снижается и уменьшаются средние размеры самок, что связано с двумя массовыми выходами молоди. С конца июля самки новой генерации текущего года начинают достигать половой зрелости и постепенно замещают самок родительского поколения.

Ключевые слова: инвазионный вид, ракообразные, *Gmelinoides fasciatus*, жизненный цикл, стратегия размножения, эмбриогенез, популяционные показатели, структура популяции, плодовитость, Онежское озеро

DOI: 10.31857/S0475145022030077

ВВЕДЕНИЕ

Вселение чужеродных видов в водные экосистемы представляет собой глобальный фактор, охвативший своим влиянием практически все континенты (Walther et al., 2009; Panov et al., 2010; Дгебуадзе и др., 2018). Это связано с глобальными изменениями природы Земли (климатическими и антропогенными), а также с возрастающей экономической интеграцией всей планеты. Расширение и интенсификация коммуникаций между разными странами часто ведет как к преднамеренному, так и к случайному вселению организмов в регионы, находящимися за пределами их нативного (исторического) ареала. В этих регионах они зачастую попадают в условия, благоприятные для натурализации (Дгебуадзе и др., 2018).

Амфипода *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) — байкальский субэндемик (рис. 1) (Чертопруд, 2006). Это единственный вид рода *Gmelinoides,* имеющий байкальское происхождение. До начала 1960-х гг. ареал этого вида был ограничен бассейнами сибирских рек: Ангара, Баргузин, Иртыш, Лена, Пясина, Тунгуска, Селенга, Енисей (Березина и др., 2012).

В 1960-ых годах амфиподу *G. fasciatus* из оз. Байкал в массовых количествах интродуцировали в западные регионы России с целью увеличения кормовой базы рыб (Бекман, 1962; Иоффе, 1968). В последние 50 лет этот инвазионный вид постоянно расширяет свой ареал, продвигаясь из мест вселения вверх и вниз по течению водотоков (Панов, 1994; Panov et al., 2000; Березина, 2001; Panov, Berezina, 2002; Berezina, 2007). Распространение *G. fasciatus* в западном регионе России происходило в два этапа: в 1962—1965 гг. рачок был заселен в р. Волга (Горьковское водохранилище) (Иванов, 2005); в 1970-х гг. — в ряд озер Карельского перешейка. Впоследствии этот вид стал заселять другие водоемы северо-западного региона России. Из озер Карельского перешейка рачок проник в крупнейший водоем Европы — Ладожское озеро, где был впервые обнаружен в 1988 г. в прибрежных зарослях рдеста и тростника у мыса Осиновец в губе Петрокрепость. За время исследований в 1988—1990 гг. *G. fasciatus* был зарегистрирован во многих литоральных сообществах макробентоса западного и северного побережий Ладожского озера (Панов, 1994).

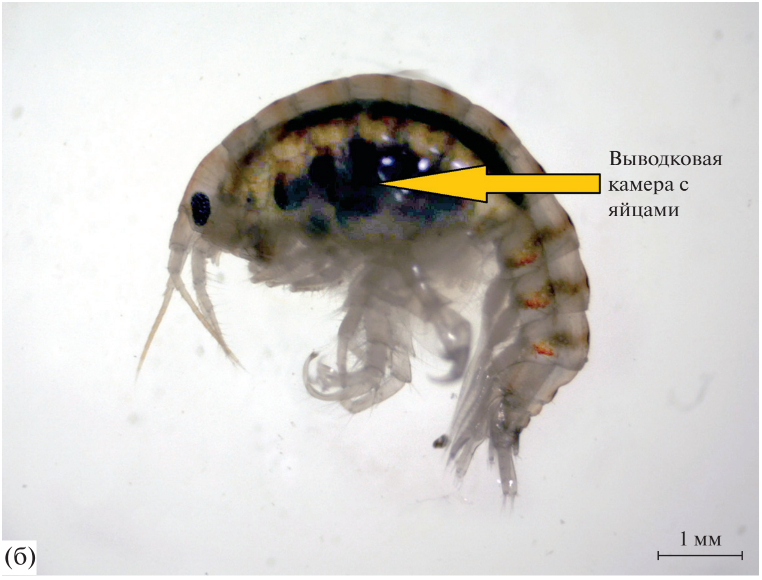

Рис. 1. Самец (а) и самка с яйцами в выводковой камере (б) *Gmelinoides fasciatus*.

За короткое время байкальская амфипода распространилась от Ладожского озера на запад (эстуарий Невы) и на восток (Онежское озеро). Вселение рачков байкальского происхождения в Финский залив могло произойти естественным путем из озера Ладожского и озер Карельского перешейка (Berezina, 2007). В пресноводной части Невской губы *G. fasciatus* был впервые обнаружен в 1996 г. (Барков, 2006). В 1999 году эта амфипода была зарегистрирована в олигогалинном эстуарии Невы, где рачок впервые отмечен в солоноватых водах (Berezina, Panov, 2003). В настоящее время этот вид стал обычным видом (Orlova et al., 2006), встречающимся в разных местах обитания, в том числе, в самой восточной части Финского залива с соленостью 0.05–2.00‰ (Berezina, 2007).

В 2001 г. *G. fasciatus* был впервые обнаружен в западной части литорали Онежского озера (Березина, Панов, 2003). Н.А. Березина и В.Е. Панов (Березина, Панов, 2003) считают, что вселение *G. fasciatus* в Онежское озеро могло произойти через р. Свирь из Ладожского озера или из оз. Белого по Волго-Балтийскому каналу. В настоящее время, донные сообщества литоральной зоны Онежского озера претерпевают значительные преобразования в результате инвазии бокоплава байкальского происхождения *G. fasciatus* (Калинкина и др., 2006; Sidorova, Belicheva, 2017), который распространился практически по всему водоему, является массовым видом в литоральной зоне и является кормовым объектом рыб (Lobanova et al., 2017; Georgiev et al., 2021). Показано, что в различных биотопах Онежского озера численность *G. fasciatus* сильно варьирует – от 1.22 до 18.79 тыс. экз./м^2 (Кухарев и др., 2008). Причины столь сильной изменчивости пространственного распределения популяции вселенца были неизвестны. Чужеродные виды амфипод, которые по характеристикам близки к видам-оппортунистам, или r-стратегам, значительно увеличивают свою численность за короткий период времени и могут становиться доминирующими видами в водоеме-реципиенте. Такие виды, как амфипода *G. fasciatus*, характеризуются коротким жизненным циклом и коротким временем производства следующей генерации, высокой плодовитостью, быстрым ростом и ранним созреванием, преобладанием самок в период размножения, высокой генетической вариабельностью, широким пищевым спектром и эврибионтностью (Berezina, Panov, 2003; Березина, 2004).

Однако, мало что известно об особенностях биологических характеристик, которые способствуют успеху амфипод в водоемах-реципиентах (Alves et al., 2019). В литературе имеются сведенья, посвященные биологии размножения вида *G. fasciatus* (главным образом, характеристикам плодовитости), в основном касающиеся животных, обитающих в оз. Байкал (Бекман, 1962), Братского водохранилища (Калматынов, Томилов, 2001) и в Невской губе Финского залива (Березина, 2005). Детальная информация о репродуктивной биологии в Ладожском озере получена Д.В. Барковым и Е.А. Курашовым (Барков, 2006; Барков, Курашов, 2011). Однако, в Онежском озере особенности размножения чужеродного вида до настоящего времени остаются мало изученными.

В последние годы усилился интерес к изучению репродуктивных стратегий и эмбриогенеза ракообразных (Kalinina, 2015; Kelly, Taylor, 2018; Alves et al., 2019). Проведено исследование нарушений развития у амфипод *Monoporeia affinis* (Lindström) в озерах Швеции (Sundelin et al., 2008). Бокоплавы *G. fasciatus* начали использоваться в качестве нового биомаркера. Так, при изучении эффектов загрязнения водной среды в Балтийском море, учитывают долю эмбрионов *G. fasciatus* с нарушениями развития (Березина и др., 2016; Березина, 2018). Знания о репродуктивных стратегиях и других особенностях жизненного цикла могут быть важны при интерпретации данных, связанных с биоиндикацией и экотоксикологией (Rinderhagen et al., 2000). Репродуктивные показатели, такие как плодовитость, могут быть использованы и при биооценке качества воды (Castro et al., 2006). Кроме того, выявление особенностей репродуктивной биологии, которые способствуют созданию новых популяций вида за пределами его естественного ареала, необходимо для прогнозирования инвазий потенциально опасных видов.

Онежское озеро представляет собой северную границу ареала распространения байкальской амфиподы *G. fasciatus* в северо-западной части России. Изучение биологии байкальского рачка в Онежском озере позволяет проследить процессы акклиматизации вида-вселенца к условиям, существенно отличающимся от исходного водоема – оз. Байкал. Адаптация вида к условиям среды за счет эволюции репродуктивной стратегии – одна из актуальных проблем экологической эволюционной биологии развития (Eco-Devo). Инвазионная амфипода *G. fasciatus* может стать перспективным модельным объектом для исследований в этом направлении.

В связи с вышеизложенным, цель настоящей работы заключалась в исследовании сезонной динамики половой структуры, стадий эмбрионального развития и плодовитости байкальского вселенца *G. fasciatus* в водоеме-реципиенте оз. Онежское на северной границе ареала Европейской части России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Местообитание объекта исследования

Онежское озеро расположено в зоне Европейского севера России и является вторым по величине пресноводным озером Европы. В естественном состоянии площадь зеркала составляла 9720 км^2, из которых 250 км^2 приходилось на 1500 островов. Протяженность озера с севера на юг составляет 248 км, с запада на восток – 96 км. Объем водной массы озера достигает 295 км^3, средняя глубина – 30 м, максимальная – 120 м. Длина береговой линии составляет 1810 км, изрезанность береговой линии – 5.12 (Филатов, 2010).

Петрозаводская губа – один из наиболее крупных заливов Онежского озера, составляющий 1.3% площади озера (Сабылина, Рыжаков, 2007). Длина ее составляет 19 км, средняя ширина – 7, площадь водной поверхности около 125 км^2, средняя глубина – 18.2 м (Малинина, Солнцева, 1972). К литоральной зоне относится 20.8% от общей площади Петрозаводской губы, она представляет собой участок шириной в 400–450 м, со сравнительно большими уклонами дна (0.022 м/км), равномерно тянущийся вдоль всей береговой линии (Кириллова, 1975). На западном берегу Петрозаводской губы располагается крупный населенный пункт – г. Петрозаводск (столица Республики Карелия), численность населения, которого составляет около 260000 человек.

Методы исследования макрозообентоса

На литорали Петрозаводской губы было организовано наблюдение за сезонной динамикой популяционных показателей *G. fasciatus* в 2010 г. (рис. 2). Мониторинговая станция представлена песчано-каменистой затишной литоралью с зарослями макрофитов, главным образом, тростника обыкновенного *Phrágmites austrális* (Cav.). Площадь зарастания на станции составила около 5 м^2. Отмечено обрастание камней нитчатыми водо-

Рис. 2. Расположение станции наблюдения в Петрозаводской губе Онежского озера.

рослями. Станция защищена от волн двумя мысами с юго-восточной и северной сторон, которые образуют небольшую бухту с затишными условиями. С учетом характера распределения вида *G. fasciatus* по глубине станция наблюдения в Петрозаводской губе была приурочена к глубине 0.4 м, где численность рачков максимальная (Сидорова, 2013).

Гидробиологический материал собирали в период с конца мая по начало октября каждые 10 дней. Отбор и обработку проб осуществляли в соответствии с руководствами по сбору пресноводного бентоса (Винберг, Лаврентьева, 1984). Для отбора проб бентоса использовали трубчатый металлический пробоотборник Панова-Павлова площадью захвата 0.07 м^2 и высотой 0.65 м (Панов, Павлов, 1986). Сборы проводились на глубине до 0.4 м из 3 точек, находящихся друг от друга на расстоянии примерно 5 м. Всего было собрано на станции 45 проб. Идентификация организмов макрозообентоса производилась с помощью микроскопа ЛОМО Микмед-6, в соответствии с определителем (Алексеев, Цалолихин, 2016). В лаборатории рачков измеряли с помощью стереомикроскопа МСП-2 вариант 2 с точностью 0.1 мм, определяли пол по наличию или отсутствию оостегитов. Сырую массу фиксированных в формалине особей *G. fasciatus* определяли путем взвешивания после сушки на фильтровальной бумаге с точностью 0.0001 г., используя лабораторные аналитические весы ВЛ-124В. Всего измерено и взвешено 411 экземпляров самцов и 577 экземпляров самок.

Статистическую обработку данных, полученных в ходе исследований, выполняли согласно методическим указаниям (Ивантер, Коросов, 2010).

Эмбриональное развитие и плодовитость

Для оценки плодовитости яйца 420 самок были извлечены из выводковых камер и посчитаны с помощью стереомикроскопа. Стадии эмбрионального развития идентифицировали по Weygoldt (1924) и Skadsheim (1982) (цит. по Pockl, 1993). Первая стадия: недавно отложенные яйца, которые могут быть окружены гиалиновой оболочкой, видны отдельные бластомеры, число которых не больше 64; 2 стадия: гиалиновая оболочка исчезла, яйцо выглядит однородным, яйцевые мембраны плотно прилегают к эмбриону; 3 стадия: у эмбриона появляется вентральная щель, продолжающаяся в подковообразную борозду и отделяющая брюшко от цефалоторакса; 4 стадия: видны зачатки конечностей; 5 стадия: пищеварительная система эмбриона содержит желтые пигментные клетки, зачатки конечностей членистые; 6 стадия: видны оранжево-красный цефалоторакс, глаза, двуветвистые сегментированные конечности; 7 стадия: вылупление из яиц и свободно плавающая молодь.

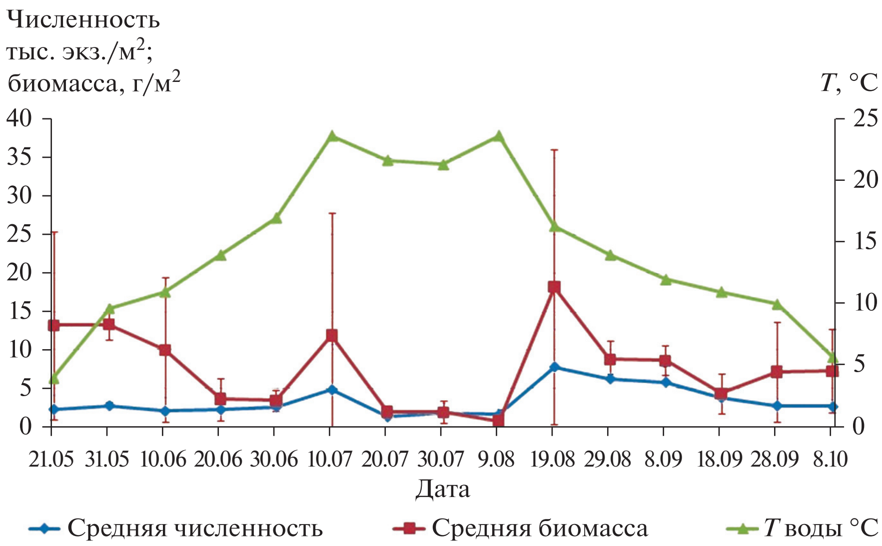

Рис. 3. Сезонная динамика численности *Gmelinoides fasciatus* (тыс. экз./м^2), биомассы *G. fasciatus* (г/м^2) и температуры воды (°С) на мониторинговой станции Петрозаводской губы Онежского озера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сезонная динамика численности и биомассы G. fasciatus

В Петрозаводской губе средняя численность амфиподы составила 3454 экз./м^2 (максимум – 13 500 экз./м^2), а средняя биомасса – 7.7 г/м^2, (максимум – 38.7 г/м^2). Максимальные значения численности и биомассы отмечены в середине августа (рис. 3).

Сезонная динамика половой структуры популяции G. fasciatus

Динамика полового состава популяции *G. fasciatus* в условиях песчано-каменистой литорали с зарослями макрофитов представлена на рис. 4. Соотношение самцов и самок в течение сезона размножения чаще всего было 1 : 1.7. По критерию χ^2 Пирсона (6.6–22.5), доля самок в этих случаях была достоверно ($p < 0.05$) выше, чем доля самцов. Особенно ярко выраженное доминирование численности самок *G. fasciatus* отмечалось в августе, в период второго массового выхода молоди из яиц, когда доля самок достигала 93% (1 : 13). В другие даты отбора проб (21, 31 мая, 20, 30 июня, 20 июля и 28 сентября) процентное соотношение между самками и самцами достоверно не отличалось от 1 : 1.

Необходимо отметить, у самок диапазон размеров и массы тела уже, чем у самцов, как в Онежском, так и в Ладожском озерах (Барков, Курашов, 2011). Так, в Онежском озере средний размер самцов на станции наблюдения составил 6.3 ± 0.1 мм, при средней биомассе – 5.7 ± 0.2 мг. Для самок средний размер был ниже – 4.9 ± 0.1 мм, при средней биомассе 3.6 ± 0.1 мг. Наибольшая длина тела самцов составила 11.5 мм с биомассой 24 мг. Максимальные размеры самок в Онежском озере достигали 9.5 мм с биомассой 10.7 мг. В Ладожском озере максимальный размер самцов *G. fasciatus*, встреченных в озере, достигал 11.8 мм при массе 29.5 мг. Преобладали особи длиной 3–7 мм

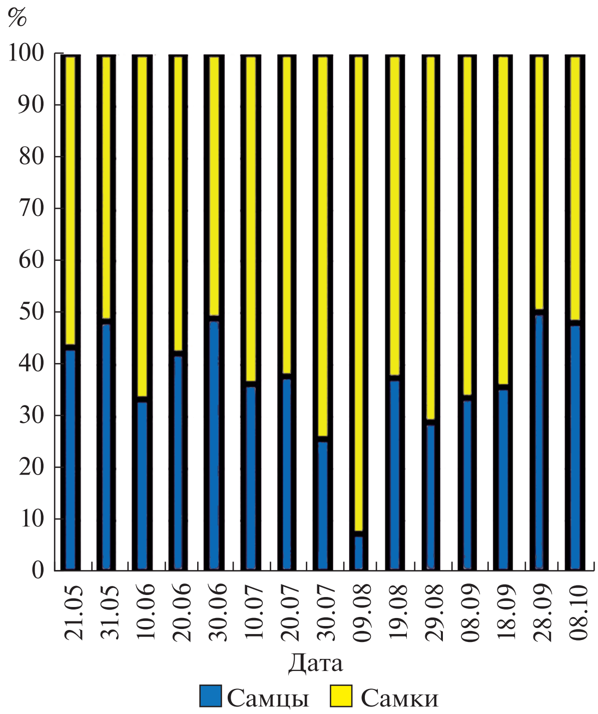

Рис. 4. Половая структура популяции *G. fasciatus* (доля самцов и самок от общей численности, %).

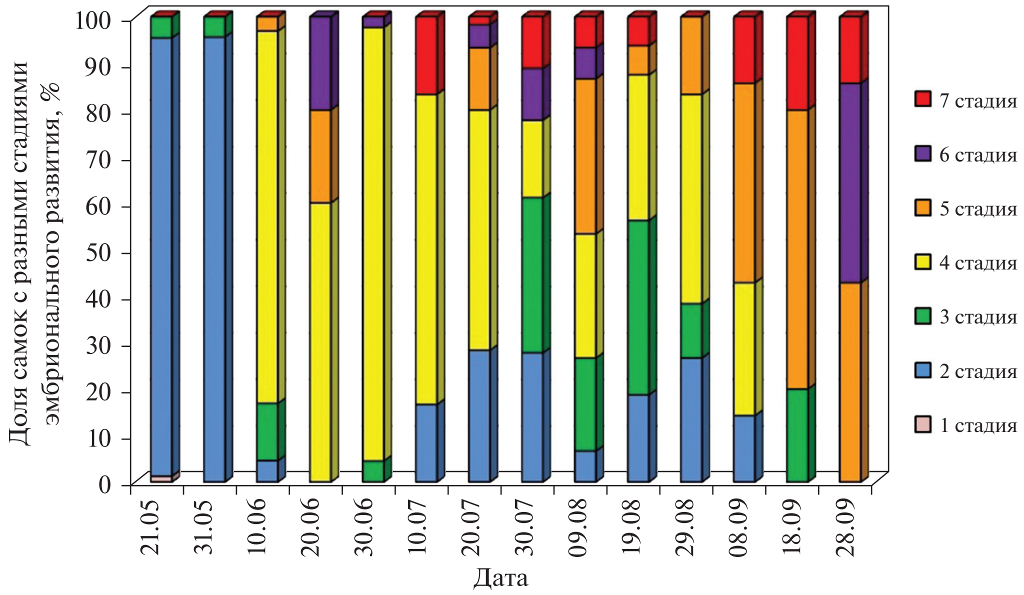

Рис. 5. Доля яйценосных самок с яйцами разных стадий эмбрионального развития в популяции в течение сезона размножения (разными цветами показаны 1–7 стадии эмбрионального развития).

и массой 0.7–6.7 мг. Подавляющее большинство самок были длиной 5.0– 6.5 мм. За период исследования размеры самок с яйцами в выводковой сумке колебались от 3.8 до 9.0 мм, плодовитость – от 3 до 35 яиц (Барков, Курашов, 2011).

Эмбриональное развитие G. fasciatus

Особенности репродуктивной биологии популяции *G. fasciatus* на литорали Онежского озера свидетельствуют о том, что в новом водоеме вселенец нашел вполне благоприятные условия для своего существования. Размножение в популяции *G. fasciatus* начинается в начале мая. В это время встречалось большое количество копулирующих пар. В последней декаде мая в пробах доминировали самки с яйцами на 2 стадии развития (согласно классификации Weygoldt (1924) и Skadsheim (1982) (цит. по Pockl, 1993)). Эти яйца недавно отложены, так как выглядели внешне однородными и не имели гиалиновых мембран. Это свидетельствует о том, что процесс размножения у данного вида начинается именно в последней декаде мая (рис. 5).

В июне в пробах присутствовали самки с яйцами на 3, 4, 5 и 6 стадиях развития, а именно: эмбрионы с вентральной щелью (3 стадия); эмбрионы с зачатками конечностей (4 стадия); эмбрионы, у которых пищеварительная система содержит желтые пигментные клетки (5 стадия); эмбрионы с отчетливо видимыми глазами, конечностями и сегментацией (6 стадия) (см. рис. 5).

В первой декаде июля доля самок с полностью развитыми эмбрионами, готовыми к выходу из яиц (7 стадия развития), достигала 20%. Кроме того, именно в конце первой декады (10 июля) был отмечен массовый выход молоди из яиц. В это же время в пробах доминировали самки с эмбрионами 4-й стадии развития (65%). Кроме того, было зарегистрировано новое массовое появление самок с начальными стадиями эмбрионального развития (15%). Этот факт указывает на вторую волну размножения *G. fasciatus*.

Со второй половины июля до начала сентября отмечены самки со всеми стадиями развития яиц. В этот период начали размножаться достигшие половозрелости самки летней генерации, которые постепенно замещают размножающихся самок прошлогодних генераций.

В конце сентября самки с яйцами на ранних стадиях развития (2, 3 и 4 стадии) отсутствовали, однако увеличилась доля самок с яйцами на поздних стадиях развития (5, 6, 7 стадии). Так, доля самок с яйцами 4 стадии развития достигала 40%. Доминировали самки с яйцами на 6 стадии (до 45%). Часть яйценосных самок с яйцами на 7 стадии эмбрионального развития составила 15% от общего количества яйценосных самок. Эти данные свидетельствуют о завершении процесса размножения *G. fasciatus*.

Плодовитость G. fasciatus

Средняя плодовитость самок *G. fasciatus* в течение сезона размножения характеризовалась четко выраженной динамикой, связанной со сменой генераций в популяции (табл. 1).

Таблица 1. Сезонное изменение линейных размеров и плодовитости яйценосных самок *G. fasciatus* в течение сезона размножения

Месяц	Количество определений	Средняя длина тела, мм ($x \pm m_x$)	Средняя плодовитость, яиц/самку ($x \pm m_x$)	Колебания плодовитости, яиц/самку
Май	167	5.4 ± 1.3	8.1 ± 3.0	3–17
Июнь	95	5.4 ± 0.8	12.2 ± 5.2	4–24
Июль	50	5.1 ± 0.6	10 ± 4.6	4–24
Август	65	4.6 ± 0.8	8.5 ± 3.4	3–17
Сентябрь	43	4.9 ± 0.8	9.8 ± 4.3	4–19

Примечание. x – среднее значение; m_x – ошибка среднего.

В конце мая – начале июня преобладали самки генерации прошлого года. Для них в начале сезона размножения характерна относительно небольшая плодовитость (8.1 яиц на самку), которая возрастает до 12.2 яиц на самку. С конца июля по сентябрь постепенно приступают к размножению самки новой генерации. Об этом свидетельствует уменьшение средних размеров самок: в конце мая средний размер самок составил 5.4 мм, в августе он снизился до 4.6–4.9 мм. Это отражает смену генераций, начало размножения самок нового поколения. Плодовитость самок новой генерации составляет 8.5–9.8 яиц на самку.

Индивидуальная плодовитость самок *G. fasciatus* в Онежском озере на станции наблюдения варьировала от 3 до 24 яиц/самку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Чужеродный вид *G. fasciatus* способен размножаться в условиях водоема-реципиента – Онежского озера. Об этом свидетельствует то, что его численность и биомасса сопоставима с популяционными показателями вида в других водоемах (табл. 2). Показано, что в озере Байкал численность *G. fasciatus* варьировала в пределах 10000–20000 экз./м^2, при биомассе 63–100 г/м^2 (Бекман, 1962). В Ладожском озере в 2004–2005 гг. численность составила 936–3141 экз./м^2, при биомассе 4.2–10.3 г/м^2 (Барков, 2006). В 2009 г. численность изменялась от 8 до 7160 экз./м^2, при биомассе – 0.024–15.3 г/м^2 (Курашов и др., 2010), что сопоставимо с результатами, полученными для Онежского озера.

Показано, что максимальные популяционные показатели инвазионного вида *G. fasciatus* отмечены, как в естественном ареале (оз. Байкал), так и вторичном ареале (оз. Псковско-Чудское, оз. Отрадное, оз. Ладожское, Финский залив Балтийского моря, Рыбинское водохранилище и Горьковское водохранилище) на глубине около 1 м.

Особенности полового состава популяции – преобладание самок в период размножения и образование “гаремов” – способствует быстрому нарастанию численности популяции (Березина, 2004). Такие же случаи доминирования доли самок над долей самцов были отмечены в зоне зарослей тростника Невской губы Финского залива Балтийского моря (Березина, 2005).

Исследование динамики эмбрионального развития проводили в озере Арахлей (Матафонов, 2020). Однако, идентификация стадий развития эмбрионов выполнялась по другим признакам. Авторы выделяли самок со свежеотложенными яйцами, самок с эмбрионами на стадии “полоски”, самок с молодью. Авторами показано, что в 2017 и 2018 гг. основной выход молоди *G. fasciatus* в оз. Арахлей происходил в июне. Последующие когорты ни в 2017, ни в 2018 гг. не были многочисленными (Матафонов, 2020). В условиях Ладожского озера массовый выход молоди в 2004 г. был отмечен 30 мая (Барков, Курашов, 2011). Продолжительность эмбрионального развития *G. fasciatus* зависит от температурных условий. Так, по экспериментальным данным, при средней температуре воды 12°C для развития необходимы 3 нед. (Барков, 2006). Следовательно, для водоемов оз. Онежское, оз. Ладожское и оз. Арахлей первый массовый выход молоди инвазионного вида приходится на конец мая или начало июня в зависимости от прогрева воды.

Плодовитость животных следует рассматривать как важнейший фактор, в значительной степени определяющий динамику численности популяции (Алимов, 1989). Знание границ репродуктивных показателей того или таксона необходимо, прежде всего, для выявления потенциальных возможностей популяций этого таксона к стабильному воспроизводству.

Полученные нами показатели индивидуальной плодовитости самок *G. fasciatus* в Онежском озере варьировали от 3 до 24 яиц на самку, что сопоставимо с данными, полученными ранее для данного водоема (табл. 2). Так, при первом обнаружении чужеродного вида на юго-западном побережье Онежского озера в 2001 г., плодовитость варьировала в

Таблица 2. Популяционные показатели *G. fasciatus* в разных водоемах

Водоемы, год исследований	Численность популяции, экз./м^2	Биомасса популяции, г/м^2	Плодовитость яиц/самку	Глубины с максимальной плотностью, м	Источники
Озеро Байкал (Посольский Сор)	10000–20000	63–100	3–32	0–1.0	Бекман, 1962
Оз. Псковско-Чудское, 1996	50–17300	0.1–102	–	0.3	Panov et al., 2000
Оз. Отрадное	26–692	–	3–34	1.0–1.2	Нилова, 1976
Ладожское озеро, 1988–1990 гг.	8–53800	0.02–158.60	–	0–1.0	Панов, 1994
Ладожское озеро, 1992 г.	6000–7000	80–100	–	–	Slepukhina et al., 1996
Ладожское озеро, 2004–2005 гг.	936–3141	4.2–10.3	3–35	0.3–0.5	Барков, 2006
Ладожское озеро, 2006 г.	9090 ± 2024	18.65 ± 3.61	–	–	Курашов, 2011
Ладожское озеро, 2009 г.	8–7160	0.024–15.3	–	–	Курашов и др., 2010
Финский залив Балтийского моря, 1998–2001 гг.	300–3000	0.4–8.8	3–46	0.4–1.2	Березина, 2005
Рыбинское водохранилище, 1990 г.	6800	19.8	3–20	–	Скальская, 1994
Западное побережье оз. Онежское, 2001 г.	1696–8256	3.9–40.3	8–18	0.2–0.5	Березина, Панов, 2003
Оз. Онежское, 2005 г. Петрозаводская губа	132–462	0.2–6.2	4–15	0.5	Калинкина и др., 2006
Оз. Онежское, 2006 г.	310–18740	0.2–12.2	–	–	Кухарев и др., 2008

Примечание. "–" – нет данных.

пределах 8–18 яиц на самку (Березина, Панов, 2003). В 2005 г. на литорали в районе города Петрозаводска плодовитость рачков составила 4–15 яиц на самку (Калинкина и др., 2006). В целом, показатели плодовитости рачков, обитающих в Онежском озере, близки к показателям *G. fasciatus* Братского водохранилища, где максимальная плодовитость достигала 26 яиц на самку (Калмыков, Томилов, 2001). В озере Байкал плодовитость самок вида *G. fasciatus* составила 3–32 яиц на самку (Бекман, 1962). В Ладожском озере плодовитость колебалась в пределах от 3 до 35 яиц на самку (Барков, Курашов, 2011). Максимальное количество яиц в марсупиуме *G. fasciatus* зарегистрировано в Невской губе Финского залива – 46 яиц на самку (Березина, 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Половой состав *G. fasciatus* в Петрозаводской губе Онежского озера характеризуется образованием "гаремов" и преобладанием доли самок над долей самцов. Данное явление способствует быстрому нарастанию численности чужеродной амфиподы в новых условиях. Плодовитость рачка варьирует от 3 до 24 яиц на самку. Детальное исследование динамики эмбрионального развития *G. fasciatus* помогло выявить два массовых выхода молоди из яиц за сезон размножения в условиях Онежского озера. Индивидуальная плодовитость самок в течение сезона размножения снижается, также уменьшаются средние размеры самок, что связано с двумя массовыми выходами молоди. С конца июля самки новой генерации начинают достигать половой зрелости и постепенно замещают самок родительского поколения.

БДАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит д. б. н. Н.М. Калинкину за плодотворное обсуждение статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института водных проблем Севера Карельского научного центра Российской академии наук.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с животными и методы эвтаназии животных соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Работа полностью выполнена одним автором А.И. Сидоровой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеев В.А., Цалолихин С.Я. (ред.) Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 2. Зообентос. М.–СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. 457 с.

Алимов А.Ф. Введение в продукционную гидробиологию. Л. Гидрометеоиздат, 1989. 152 с.

Барков Д.В. Экология и биология байкальского вселенца *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) и его роль в экосистеме Ладожского озера: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 26 с.

Барков Д.В., Курашов Е.А. Популяционная характеристика и жизненный цикл байкальского вселенца *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) (Crustacea: Amphipoda) в Ладожском озере // Биология внутренних вод. 2011. № 2. С. 46–56.

Бекман М.Ю. Экология и продукция *Micruropus possolsii* Sow. и *Gmelinoides fasciatus* Stebb. // Труды Лимнологического института Сибирского отделения АН СССР. 1962. Т. 2. Ч. 1. С. 141–155.

Березина Н.А. Петряшев В.В., Шаров А.Н. Значение чужеродных видов высших ракообразных в континентальных водоемах Северо-запада России // Сборник лекций и докладов международной школы-конференции. Ин-т биологии внутр. вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, 5–9 ноября 2012 г. Кострома: ООО Костромской печатный дом, 2012. С. 137–140.

Березина Н.А. Применение новых биомаркеров эмбриональных нарушений у амфипод для оценки экологического состояния Балтийского моря // Загрязнение морской среды: экологический мониторинг, биоиндикация, нормирование. Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 125-летию профессора В.А. Водяницкого. Севастополь, 28 мая–1 июня, 2018 г. – Севастополь : “Колорит”, 2018. С. 29–33.

Березина Н.А. Причины, особенности и последствия распространения чужеродных видов амфипод в водных экосистемах Европы // Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. С. 254–268.

Березина Н.А. Сезонная динамика структуры и плодовитость популяции байкальского бокоплава (*Gmelinoides fasciatus,* Ampipoda, Crustacea) в зарослевой зоне Невской губы // Зоологический журн. 2005. Т. 84. № 4. С. 411–419.

Березина Н.А., Панов В.Е. Вселение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежское озеро // Зоологический журн. 2003. Т. 82. № 6. С. 731–734.

Березина Н.А., Губелит Ю.И., Поляк Ю.М. и др. Комплексная оценка состояния прибрежных местообитаний Финского залива Балтийского моря // Морские биологические исследования: достижения и перспективы. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции: в 3 томах. ЭКОСИ-Гидрофизика. 2016. С. 252–255.

Березина Н.А., Хлебович В.В., Панов В.Е. и др. Соленостная резистентность интродуцированной в бассейн Финского залива (Балтийское море) амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) // Доклады Академии Наук. 2001. Т. 379. № 3. С. 414–416.

Винберг Г.Г., Лаврентьева Г.М. (ред.) Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зообентос и его продукция. Л.: ГосНИОРХ, 1984. 52 с.

Дгебуадзе Ю.Ю., Петрозян В.Г., Хляп Л.А. (ред.) Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100). М.: Тов-во научных изданий КМК, 2018. 688 с.

Иванов В.К. Структура и взаимодействие в сообществе макробеспозвоночных прибрежья Рыбинского водохранилища при доминировании *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) // Чужеродные виды в Голарктике (БОРОК-2). Тез. док. Второго международного Симпозиума по изучению инвазийных видов. Борок, Россия 27 сентября–10 октября 2005 г. Рыбинск-Борок, 2005. С. 81–82.

Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 2010. 104 с.

Иоффе Ц.И. Обзор выполненных работ по акклиматизации кормовых беспозвоночных для рыб в водохранилищах // Изв. ГосНИОРХ. 1968. Т. 67. С. 7–29.

Калинкина Н.М., Сярки М.Т., Федорова А.С. Динамика популяционных показателей инвазионного вида *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) в Петрозаводской губе Онежского оз. // Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика. Мат. междун. конф., посвящ. 60-летию КарНЦ РАН (24–27 окт. 2006 г.). Петрозаводск, 2006. С. 269–271.

Калматынов Р.М., Томилов А.А. Динамика популяции *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) (Crustacea, Amphipoda) в Братском водохранилище // Природные ресурсы Забайкалья и проблемы природопользования. Материалы научной конференции 10–15 сентября 2001 г. Чита, 2001. С. 490–491.

Кириллова В.А. Морфометрическая характеристика литоральной зоны Онежского озера // Литоральная зона Онежского озера. Ленинградское отд. Л.: Наука, 1975. С. 15–21.

Курашов Е.А., Панов В.Е., Барбашова М.А. Первое обнаружение инвазивной амфиподы *Chelicorophium curvispinum* (G.O. Sars, 1895) (Amphipoda, Crustacea) в

Ладожском озере // Российский журн. биологических инвазий. 2010. № 3. С. 62–71

Курашов Е.А. (ред.) Литоральная зона Ладожского озера. СПб.: Нестор-История, 2011. 416 с.

Кухарев В.И., Полякова Т.Н., Рябинкин А.В. Распространение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Ampipoda, Crustacea) в Онежском озере // Зоологический журн. Т. 87. № 10. 2008. С. 1270–1273.

Малинина Т.И., Солнцева Н.О. Сейши Онежского озера // Динамика водных масс Онежского озера. Л., 1972.

Матафонов П.В. Жизненный цикл бокоплавов *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) и *Gammarus lacustris* (Sars, 1863) в оз. Арахлей в экстремально маловодную фазу гидрологического цикла // Амурский зоологический журн. 2020. Т. XII. № 1. С. 16–25.

Нилова О.И. Некоторые черты экологии и биологии *Gmelinoides fasciatus* Stebb., акклиматизированных в озере Отрадное Ленинградской области // Изв. Гос. научн.-исслед. ин-та озерн. и речн. хоз-ва. 1976. Т. 110. С. 10–15.

Панов В.Е. Байкальская эндемичная амфипода *Gmelinoides fasciatus* Stebb. в Ладожском озере // Доклады Академии Наук. 1994. Т. 336. № 2. С. 279–282.

Панов В.Е., Павлов А.М. Методика количественного учета водных беспозвоночных в зарослях камыша и тростника // Гидробиологический журн. 1986. Т. 22. № 6. С. 87–88.

Сабылина А.В., Рыжаков А.В. Онежское озеро и его притоки. Общая характеристика // Состояние водных объектов Республики Карелия по результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск, 2007. С. 29–40.

Сидорова А.И. Структурно-функциональные характеристики популяции байкальского вселенца *Gmelinoides fasciatus* Stebbing (Crustacea: Amphipoda) на северной границе ареала (Онежское озеро). Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2013. 25 с.

Скальская И.А. Расселение байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) в Рыбинском водохранилище // Биология внутренних вод. Информационный бюллетень № 96. СПб.: Наука, 1994. С. 35–40.

Филатов Н.Н. (ред.) Онежское озеро. Атлас. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. С. 151.

Чертопруд М.В. Фауна бокоплавов (Crustacea, Amphipoda) Московской области // Биология внутренних вод. 2006. № 4. С. 17–21.

Alves D.F.R., Greco L.S.L., Barros-Alves S.P. et al. Sexual system, reproductive cycle and embryonic development of the red-striped shrimp *Lysmata vittata*, an invader in the western Atlantic Ocean // PLoS One. 2019. V. 14(1): e0210723.

Berezina N.A. Changes in aquatic ecosystems of the northwestern Russia after introduction of Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* // Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats / Ed. Gherardi F. Springer, Dordrecht, the Netherlands, 2007. P. 479–493.

Berezina N.A., Panov V.E. Establishment of new gammarid species in the eastern Gulf of Finland (Baltic Sea) and their effects on littoral communities // Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol. 2003. V. 52(3). P. 284–304.

Castro H., Ramalheira F., Quintino V. et al. Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: an example from Ria de Aveiro, NW Portugal // Marine Pollution Bulletin. 2006. № 53. P. 91–99.

Georgiev A.P., Sidorova A.I., Shustov Yu.A. et al. The Baikal amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) in the diet of perch in the littoral zone of Lake Onega (age and seasonal characteristics) // Biology Bulletin. 2021. V. 48. Suppl. 1. P. S24–S32.

Kalinina M.V. Fertility and embryonic mortality level of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (Crustacea: Decapoda: Varunidae) in Primorye // Russian J. Developmental Biology. 2015. V. 46. P. 333–341.

Kelly K.L., Taylor Car M. Effects of crude oil on survival and development in embryonated eggs in *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda, Portunidae) // PeerJ. 2018. V. 6. P. 123–146.

Lobanova A.S., Sidorova A.I., Georgiev A.P. et al. The role of invasive amphipod *Gmelonoides fasciatus* (Stebbing) in the feeding of perch *Perca fluviatilis* L. in the littoral zone of Lake Onega // Russian J. Biological Invasions, 2017. V. 8. № 3. P. 261–265.

Orlova M.I., Telesh I.V., Berezina N.A. et al. Effects of nonindigenous species on diversity and community functioning in the eastern Gulf of Finland (Baltic Sea) // Helgoland Marine Research. 2006. V. 2. P. 98–105.

Panov V.E., Alexandrov B., Arbaiauskas K. et al. Risk assessment of aquatic invasive species introductions via European inland waterways // Atlas of Biodiversity Risk / Eds. Josef Settele, Lyubomir Penev, Teodor Georgiev, Ralf Grabaum, Vesna Grobelnik, Volker Hammen, Stefan Klotz, Mladen Kotarac, Ingolf Kuhn. Pensoft. Sofia. 2010. P. 140-143.

Panov V.E., Berezina N.A. Invasion history, biology and impacts of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) // Invasive Aquatic Species of Europe / Eds. Leppäkoski E., Olenin S., Gollasch S. Dordrecht: Kluwer Publisher, 2002. P. 96–103.

Panov V.E., Timm T., Timm H. Current status of an introduced Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* Stebbing, in the littoral communities of Lake Peipsi // Proceedings of Estonian Academy of Sciences, Biology, Ecology. 2000. V. 49. P. 71–80.

Pockl M. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers // Freshwater Biology. 1993. V. 30. P. 73–91.

Rinderhagen M., Ritterhoff J., Zauke G.P. Crustaceans as bioindicators // Biomonitoring of PollutedWater – Reviews on Actual Topics / Ed. Geerhardt A. Trans Tech Publications/Scitech Publications, Zurich. 2000. P. 161–194.

Sidorova A., Belicheva L. Distribution and population structure of the invasive amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) in Lake Onego // Environment. Technology. Resources, Rezekne, Latvia Proceedings of the 11th International Scientific and Practical Conference. 2017. V. I. P. 259–264.

Skadsheim A. The ecology of intertidal amphipods in the Oslofjord // The Life Cycles of *Chaetogammarus marinus* and *C. stoerensis*. Publicazloni Stazioni Zoologici di Napoli (Marine Ecology). 1982. № 3. P. 213–222.

Slepukhina T.D., Belyakova I.V., Chichikalyuk Y.A. et al. Bottom sediments and biocoenoses of northern Ladoga and their changes under human impact // Hydrobiologia. 1996. V. 322. P. 23–28.

Sundelin B., Rosa R., Eriksson Wiklund A.-K. Reproduction disorders in a benthic amphipod, *Monoporeia affinis*, an effect of low food quality and availability // Aquatic Biology. 2008. V. 2. P. 179–190.

Walther G.R., Roques A., Hulme P.E. et al. Alien species in a warmer world – risks and opportunities // Trends in Ecology and Evolution. 2009. № 24. P. 686–693.

Weygoldt P. Die Embryonalentwicklung des Amphipoden *Gammarus pulex* // Zoologische Jahrbucher (Abteilung Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere). 1924. № 77. P. 51–110.

Features of Reproductive Biology of Invasive Species *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea: Amphipoda) Inhabiting the Lake Onega

A. I. Sidorova*

Northern Water Problems Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185030 Russia

**e-mail: bolt-nastya@yandex.ru*

The paper considers features of the reproductive biology of invasive species *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) (Crustacea: Amphipoda) that contribute to its naturalization in recipient reservoirs. The population of this species in the Petrozavodsk Bay of Lake Onega is characterized by the predominance of females over males and the formation of harems. This phenomenon contributes to the rapid growth in the number of alien species in the new environment. The fecundity of the species varied from 3 to 24 eggs per female. The study of the dynamics of embryonic development showed that two mass hatchings take place during the reproduction season in Lake Onega. The body size and age pattern of egg-bearing females have been characterized. A decrease in individual fecundity and average body size of females occurred during the reproduction season was associated with two mass hatchings. From the end of July, the females of the new generation of the current year begin to reach sexual maturity and gradually replace the females of the parent generation.

Keywords: invasive species, crustatians, *Gmelinoides fasciatus*, embryogenesis, reproductive strategy, life history, population indicators, population structure, fecundity, Lake Onega

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 214–223

МОРФОГЕНЕЗ

УДК 611.81.013

КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫСЫ В ХОДЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И ПРИ СТАРЕНИИ

© 2022 г. В. А. Разенкова[a], *, Д. Э. Коржевский[a]

[a]ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2021 г.
После доработки 11.01.2022 г.
Принята к публикации 16.01.2022 г.

Цель настоящего исследования состояла в изучении динамики морфологических изменений катехоламинергических структур коры головного мозга крыс на протяжении постнатального онтогенеза. С применением методов иммуногистохимии были изучены препараты конечного мозга крыс на сроках: 7-е, 30-е сут постнатального развития, 4–6 мес., 23 мес. Было показано, что отдельные области коры благодаря своим функциональным особенностям имеют уникальное распределение катехоламинергических волокон. Была проанализирована возрастная динамика изменения плотности распределения ТГ-положительных волокон и установлено, что плотность катехоламинергических волокон в сенсомоторной коре возрастает при старении. Продемонстрировано, что метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии обладает широкими возможностями для качественного и количественного анализа результатов иммуноцитохимического исследования и может использоваться для анализа распределения тирозингидроксилазы.

Ключевые слова: тирозингидроксилаза, головной мозг, развитие, старение, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0475145022030065

ВВЕДЕНИЕ

Катехоламинергические структуры коры конечного мозга позвоночных животных представлены, в основном, отростками норадренергических нейронов группы А6 голубого пятна и отростками дофаминергических нейронов группы А10 вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) и группы А9 черной субстанции (substantia nigra, SN) (Сухорукова и др., 2014). Их нейротрансмиттеры: дофамин и норадреналин, – играют ключевую роль в регуляции многих физиологических (таких как локомоторная, эндокринная) (Баришполец и др., 2009) и когнитивных (в частности, обучение и память) (Cools, 2008) функций центральной нервной системы. Развитие катехоламинергической системы у крыс начинается к концу второй недели эмбрионального онтогенеза (Gates et al., 2006; Bissonette, Roesch, 2016), а окончательное формирование катехоламинергических структур головного мозга приходится на конец четвертой недели постнатального развития (Kalinina et al., 2012). Однако критическими периодами развития этой медиаторной системы считается именно первый месяц постнатального онтогенеза, что подтверждается долговременным изменением системы и регулируемых ею функций при воздействии на организм лабораторных животных в данный период (Bonnin et al., 1996; Калинина, Дыгало, 2013; Сухарева и др., 2016).

Вместе с закладкой катехоламинергических нейронов мозга, в этих клетках начинается экспрессия тирозингидроксилазы (ТГ) – фермента, катализирующего первый этап биосинтеза как дофамина, так и норадреналина (Ugrumov et al., 1989, 2002). Вследствие этого, присутствие в клетке тирозингидроксилазы свидетельствует о ее способности к синтезу катехоламинов, что позволяет считать данной фермент маркером катехоламинергических нейронов. Низкие при рождении уровни мРНК тирозингидроксилазы у грызунов увеличиваются с возрастом, однако у динамики изменения экспрессии, активности фермента и характера его распределения существуют региональные особенности (Kalinina et al., 2012).

Наряду с развитием, важным фактором, влияющим на функционирование нервной системы, является старение. Этот естественный процесс характеризуется прогрессирующим снижением физиологических функций организма. В ходе исследований было доказано, что прогрессирующие поражения ЦНС при старении как на структурном, так и на функциональном уровне напрямую связаны с нейродегенеративными расстройствами, развитие которых обусловлено изменением активности катехоламинергической системы головного мозга (Hamezah et al., 2017).

Особую роль катехоламины играют в функционировании лимбической системы головного мозга. Одной из ключевых ее структур является цингулярная кора, которая находится на медиальной поверхности мозга между поясной бороздой и мозолистым телом. Цингулярная кора – высокофункциональная область головного мозга с особой структурной организацией (Vogt et al., 2004). Она принимает участие в регуляции многих функций организма, от обработки информации до сложных когнитивных и социальных реакций (Rushworth et al., 2011). Еще один отдел коры головного мозга, тесно связанный с лимбической системой – инсулярная кора – у грызунов располагается на боковой поверхности полушария над носовой бороздой. Это – особый сайт мультимодальной интеграции сенсорных, эмоциональных и когнитивных систем ЦНС, связанный с корой (лобная, теменная и височную доли, а также лимбическая кора), базальными ганглиями и другими отделами мозга (такими как таламус) (Gogolla, 2017; Kortz, Lillehei, 2021; Livneh, Andermann, 2021). Как и цингулярная кора, инсулярная область имеет свои структурные особенности. Многие анатомические и функциональные свойства этой области считаются у грызунов и людей общими (Gogolla, 2017). Эти факторы обеспечивают области инсулярной коры пристальное внимание как в фундаментальных нейробиологических, так и в клинических исследованиях.

Несмотря на важность выяснения процессов, обеспечивающих развитие катехоламинергической системы обозначенных областей головного мозга, механизмы, лежащие в их основе, до сих пор остаются не вполне понятными. Предполагается, что всесторонняя характеристика морфологических процессов, происходящих в катехоламинергической системе неокортекса в ходе развития и нормального старения, может помочь сформировать представление об организации малоизученных отделов коры.

В связи с этим, целью настоящего исследования стало изучение динамики морфологических изменений катехоламинергических структур коры головного мозга крыс, происходящих в постанатальном онтогенезе, с применением иммуногистохимического окрашивания на тирозингидроксилазу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования использовали срезы головного мозга крыс-самцов породы Вистар, взятые на разных сроках постнатального онтогенеза: 7-е (P7), 30-е (P30) постнатальные сутки, половозрелые (5–6 мес.) и старые (23 мес.) животные ($n = 3$ для каждого срока). При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.), "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и "Правила надлежащей лабораторной практики" (приказ № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (заключение № 1/20 от 27.02.2020). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) и заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм и наклеивали их на предметные стекла с адгезивным покрытием "Superfrost Ultra Plus" (Menzel Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препаратов проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 24 мин. Ингибирование эндогенной пероксидазы осуществляли путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Для выявления катехоламиергических структур использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. В качестве вторичных реагентов использовали козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3,3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Полученные препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Для анализа изображений использовали программу ImageJ (Wayne Rasband (NIH), США).

Чтобы получить препараты для исследования на конфокальном сканирующем микроскопе, срезы после инкубации во вторичных антителах и отмывки в буфере обрабатывали раствором козьих антител против пероксидазы хрена, конъюгированные с флуорохромом Cy3, в который добавляли ДНК-связывающий краситель SYTOX Green до конечной концентрации красителя 0.6 мкг/мл (Invitrogen, США). Анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 800, оснащенного системой Airyscan (Carl Zeiss AG, Германия). Использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat

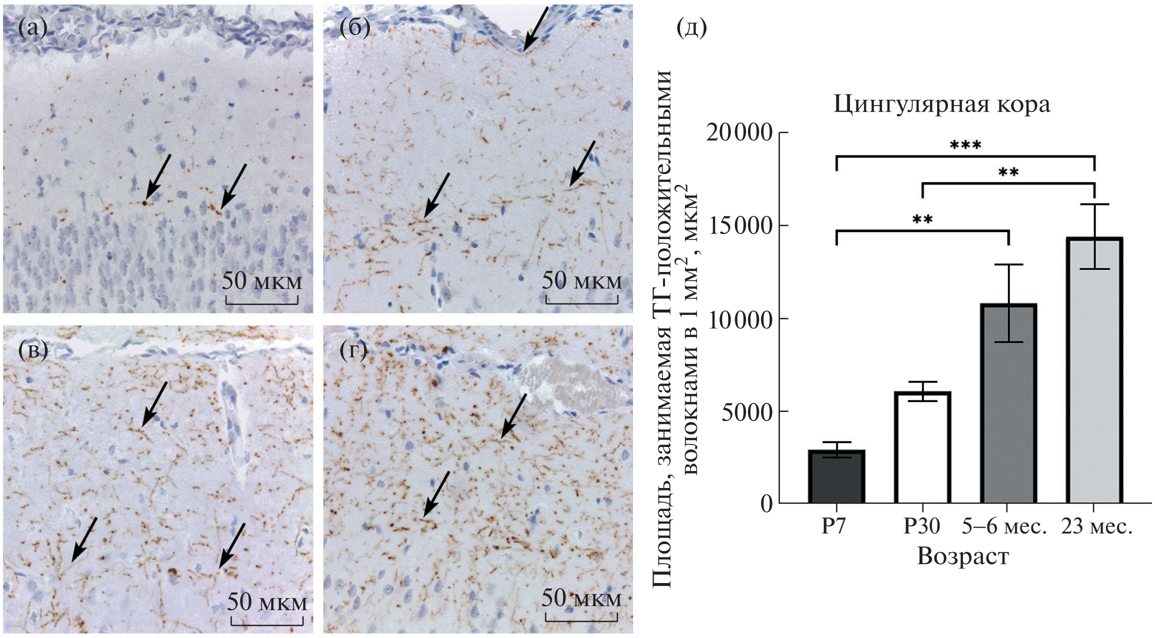

Рис. 1. Возрастные изменения катехоламинергических волокон в цингулярной коре. (а) – 7-е сут постнатального развития, (б) – 30-е сут постнатального развития, (в) – половозрелое животное, (г) – старое животное, (д) – динамика изменения плотности распределения ТГ-положительных волокон цингулярной коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. Стрелки указывают на катехоламинергические волокна. P7, P30 – 7, 30 сут постнатального развития соответственно. *P*-value: ** – <0.01; *** – <0.001.

63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флуоресценции Cy3 применяли лазер с длинной волны 561 нм, для SYTOX Green – 488 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерной программы Zen-2012 (Zeiss, Германия).

Для оценки плотности распределения волокон измеряли общую площадь (area), занимаемую отростками катехоламинергических клеток (в квадратных мкм) в рамке 175 × 198 мкм на увеличении ×40, затем стандартизировали по длине шкалы в 1 мм. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные представляли в виде среднего значения ± ошибки средней. На основании проверки на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка, для сравнения данных применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), с последующим сравнением групп с помощью post-hoc-критерия Тьюки, либо однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с применением post-hoc-критерия Данна. Распределение считали соответствующим нормальному при $P > 0.05$. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате иммуногистохимической реакции на срезах переднего мозга крыс выявляются отростки и тела катехоламинергических нейронов.

В слоях неокортекса на 7-е постнатальные сутки распределены редкие ТГ-иммунореактивные волокна. В первом слое коры они представлены, в основном перерезанными поперек отростками нейронов (рис. 1). В низлежащих слоях расположены тонкие волокна с четкообразными утолщениями. Отдельные волокна могут прослеживаться на небольшом расстоянии в толще нейропиля. Плотность их распределения неравномерна в различных слоях коры: наиболее высокая в верхних и нижних слоях, низкая – в средних. В шестом слое коры содержится большое количество горизонтальных катехоламинергических волокон. Область пояса и первый слой цингулярной коры заполнены крупными перерезанными поперек интенсивно окрашенными отростками. Что касается различий между разными регионами кортекса, наибольшей плотностью распределения ТГ-иммунопозитивных отростков отличается инсулярная область коры (в сравнении с сенсомоторной корой, Shapiro–Wilk test $P < 0.05$, Kruskal–Wallis test, post-hoc критерий Данна $P < 0.05$) (рис. 2, 3).

Помимо отростков, в коре могут располагаться единичные тела катехоламинергических нейронов. Это довольно крупные клетки овальной или звездчатой формы, от сомы которых отходит один ветвящийся отросток. Наиболее часто они встречаются в VI слое M2 области сенсомоторной коры и в пириформной коре (рис. 4).

К 30-м постнатальным суткам незначительно возрастает интенсивность реакции за счет усиле-

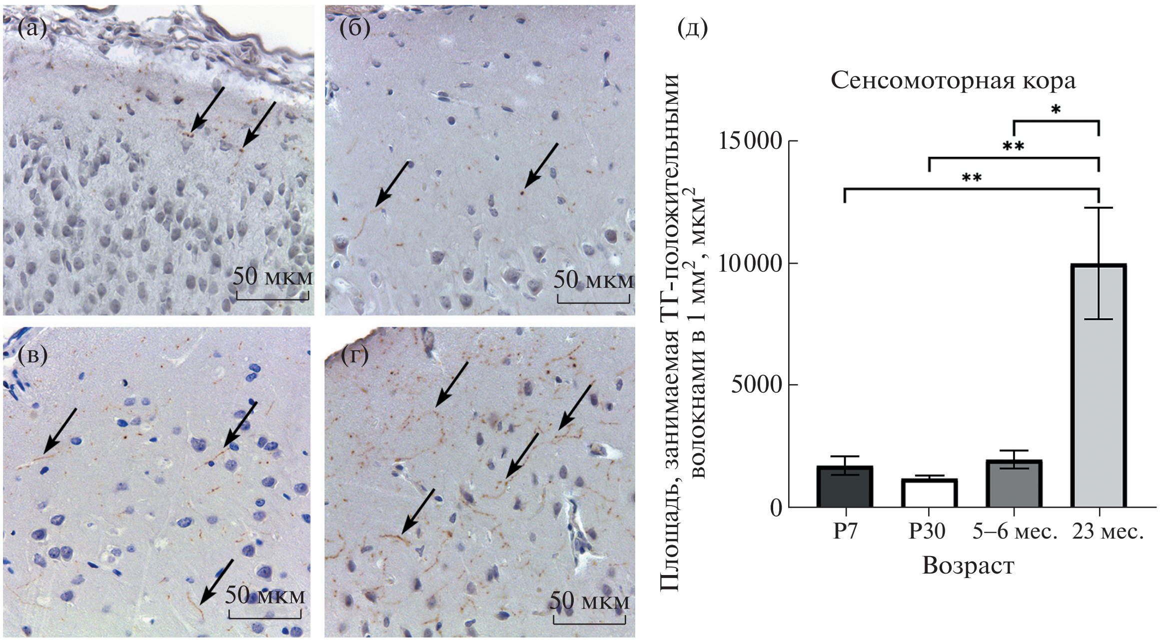

Рис. 2. Морфологические изменения, происходящие с ТГ-положительными волокнами в области сенсомоторной коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. (а) – 7-е сут постнатального развития, (б) – 30-е сут постнатального развития, (в) – половозрелое животное, (г) – старое животное, (д) – динамика изменения плотности распределения ТГ-положительных волокон сенсомоторной области коры. Стрелки указывают на катехоламинергические волокна. P7, P30 – 7, 30 сут постнатального развития соответственно. *P*-value: * – <0.05; ** – <0.01.

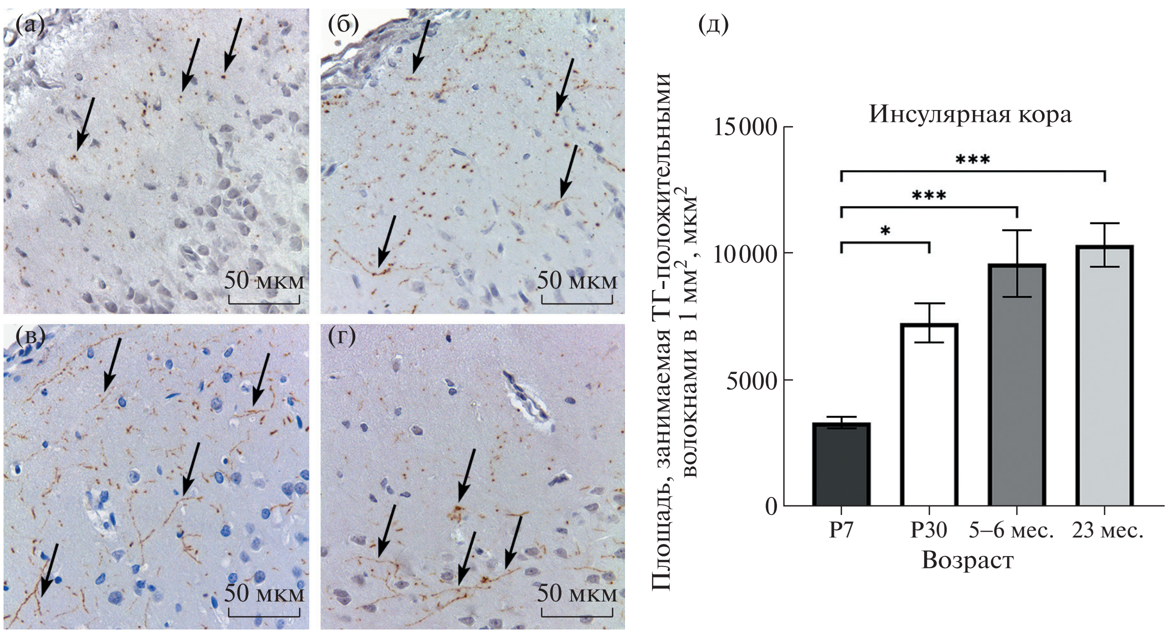

Рис. 3. ТГ-положительные волокна инсулярной коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. (а) – 7-е сут постнатального развития, (б) – 30-е сут постнатального развития, (в) – половозрелое животное, (г) – старое животное, (д) – динамика изменения плотности распределения ТГ-положительных волокон инсулярной коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. Стрелки указывают на катехоламинергические волокна. P7, P30 – 7, 30 сут постнатального развития соответственно. *P*-value: * – <0.05; *** – <0.001.

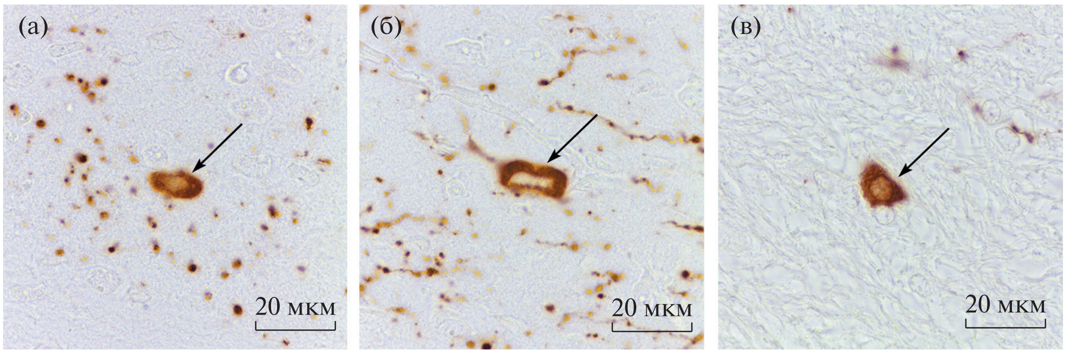

Рис. 4. ТГ-иммунопозитивные клетки в коре головного мозга крыс разного возраста. (а) – 7-е сут постнатального развития, VI слой цингулярной коры, (б) – 7-е сут постнатального развития, III слой пириформной коры, (в) – старое животное, белое вещество. Стрелки указывают на катехоламинергические клетки.

ния ветвления ТГ-положительных отростков в пределах коры. В первом слое поясной коры волокна активно ветвятся (см. рис. 1б), однако, их ветви в большинстве случаев не выходят за пределы слоя, что подтверждается методами конфокальной микроскопии. Данное наблюдение неприменимо для вертикально направленных редковетвящихся волокон III–V слоев, которые могут проходить через несколько слоев коры. В VI слое и поясе наблюдали в основном перерезанные поперек волокна с высокой интенсивностью иммуногистохимической реакции.

Плотность волокон резко снижается в сенсомоторной коре (Shapiro–Wilk test $P > 0.05$, ANOVA, post-hoc критерий Тьюки $P < 0.05$). Интенсивность реакции в этой области коры невысокая и возрастает в прилегающем к белому веществу VI слое за счет наличия в нем умеренного количества горизонтальных волокон. Как и у 7-ми дневных животных, у крыс, достигших возраста 1 мес., ярковыраженной иммуногистохимической реакцией обладает инсулярная кора (рис. 3б). Для ее первого слоя характерно наличие поперечноперерезанных отростков катехоламинергических клеток. В отличие от области поясной коры, длинных ветвящихся волокон в первом слое почти не встречается. Средние слои инсулярной коры заполнены большим количеством тонких сильноветвящихся волокон. В основном эти ветви не выходят за пределы своих слоев. Для инсулярной и цингулярной областей коры на этом сроке характерна примерно одинаковая интенсивность послойного распределения ТГ-иммунопозитивных волокон. ТГ-иммуноположительные нейроны на этом сроке не наблюдали.

У половозрелых животных происходит увеличение плотности распределения волокон в нейропиле инсулярной и цингулярной областей коры (а также в М2 области сенсомоторной коры, прилежащей к цингулярной). В остальной сенсомоторной коре наблюдали очень слабую реакцию во всех слоях кроме шестого. Наиболее плотно в цингулярной коре располагаются волокна в верхних и средних слоях, и наоборот, в области инсулярной коры большое количество сильноветвящихся отростков выявляли в средних и нижних слоях. На этом исследуемом сроке также выявляются единичные катехоламинергические нейроны. Их наблюдали реже, чем у 7-дневных животных и только в нижних слоях прилежащей к цингулярной коре М2 области сенсомоторной коры.

В ходе исследования препаратов коры старых животных визуально отмечалось увеличение ТГ-положительных волокон в сенсомоторной коре при снижении общей интенсивности окрашивания. При старении отростки сенсомоторной и цингулярной областей коры начинают более интенсивно ветвиться (рис. 1г, 2г). С помощью морфометрического анализа было показано, что площадь, занимаемая отростками катехоламинергических нейронов, увеличивается в сенсомоторной коре (Shapiro–Wilk test $P > 0.05$, ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $P < 0.05$), однако, остается примерно одинаковой в цингулярной и инсулярной областях коры в сравнении с половозрелыми животными (Shapiro–Wilk test $P > 0.05$, ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $P > 0.05$). На этом сроке, как и у 30-дневных животных, ТГ-положительных клеток в неокортексе не выявляли, но наблюдали редкие нейроны в прилегающих к коре проводящих путях мозолистого тела (рис. 4в).

Данные результаты были проверены с использованием методов конфокальной микроскопии. Для этого проводили последовательное сканирование участков сенсомоторной коры по оси Z с шагом 0.2 мкм, что позволило получить трехмерные реконструкции выбранных областей с конечной толщиной 3 мкм. Было выявлено, что описанное на световом уровне распределение ТГ-иммунопозитивных волокон в области сенсомоторной коры наблюдается и при применении высокоточных методов сканирующей конфокальной лазер-

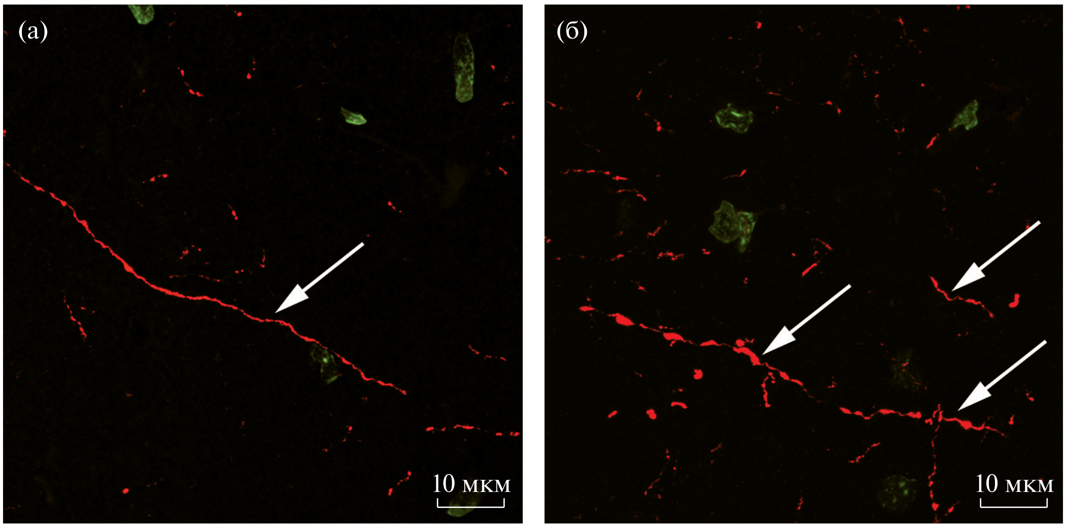

Рис. 5. Первый слой сенсомоторной коры у половозрелых и старых животных. Конфокальная лазерная микроскопия, иммуногистохимическая реакция на ТГ (красный цвет) с подкраской SYTOX Green (зеленый цвет), двухмерная проекция Z-серии толщиной 3 мкм. (а) – половозрелое животное, (б) – старое животное. Стрелки указывают на ТГ-положительные волокна.

ной микроскопии (рис. 5). Как показал анализ оптических срезов, для области сенсомоторной коры старых животных характерно усиление иммуногистохимической реакции вследствие более активного ветвления катехоламинергических волокон.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало неоднородность распределения ТГ-иммуноположительных волокон и терминалей в конечном мозге. Наиболее интенсивно окрашенные области соответствуют корковым отделам лимбической системы, тесно связанными с мезокортикальными дофаминергическими нейронами в VTA и SN и норадренергических нервных клеток голубого пятна (Fallon, 1981; Ohara et al., 2003). Довольно интенсивно окрашены нижние слои коры и область пояса, в которых проходят проводящие пути (Григорьев и др., 2018). При этом катехоламинергические волокна распределены по всему неокортексу старых животных примерно с одинаковой интенсивностью.

Важно упомянуть, что, согласно литературным данным (Brownstein et al., 1974; Nomura et al., 2014), кора головного мозга крысы получает достаточно интенсивную норадренергическую иннервацию. Наряду с этим, недостатком используемого метода является невозможность определить точную медиаторную принадлежность наблюдаемых в коре терминалей. Помимо ТГ, которая является ферментом, лимитирующим скорость синтеза катехоламинов, существуют также специфические ферменты, катализирующие реакции синтеза дофамина, норадреналина и адреналина: декарбоксилаза ароматических аминокислот, дофамин β-гидроксилаза и фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза соответственно. Однако, декарбоксилаза ароматических аминокислот также катализирует образование серотонина из 5-гидрокситриптофана, а наличие в коре головного мозга адренергической иннервации остается дискуссионным вопросом. Определенной трудностью в оценке отдельных элементов катехоламинергической системы с помощью исследования экспрессии тирозингидроксилазы является также и наличие в головном мозге так называемых моноферментных нейронов, содержащих только один из ферментов каскада синтеза дофамина и участвующих в кооперативном синтезе нейротрансмиттера (Угрюмов, 2009). Таким образом, использование предложенной методики позволяет опосредованно анализировать как развитие катехоламинергической системы головного мозга, так и влияние на нее нормального старения.

Особый интерес к изучению постнатального развития катехоламинергической системы коры головного мозга возник из-за данных, иллюстрирующих постепенное улучшение результатов в когнитивных задачах, опосредуемых дофаминергической системой, в течение молодого возраста и до достижения половой зрелости (Reynolds, Flores, 2021). Так было выявлено, что активность дофамина в лобных отделах коры линейно увеличивается от рождения и до достижения половой зрелости, предположительно в ходе позднего формирования катехоламинергической иннервации (Berger et al., 1985; Reynolds et al., 2018; Reynolds, Flores, 2021). Сообщается, что созревание дофаминергической иннервации коры продолжается в постнатальном развитии и созревает к 60-м постнатальным суткам (Areal, Blakely, 2020). В отличие от коры, изменения активности дофамина после первого месяца постнатального развития и до взрослого возраста в подкорковых структурах (а именно, в полосатом теле и обонятельном бугорке) не связано с изменениями плотности иннервации катехоламинергическими нейронами, поскольку мезолимбический и нигростриарный пути у грызунов формируются к 20-м постнатальным суткам (Voorn et al., 1988; Björklund, 1992), поэтому после этого периода плотность ТГ-положительных волокон в подкорковых структурах не изменяется так, как в коре. В отношении же норадренергической системы головного мозга отмечают достаточно быстрое градуальное созревание норадренергической иннервации неокортекса. При этом уже на 9-е постнатальные сутки активность норадренергической системы достигает уровня, характерного для половозрелых крыс (Levitt, Moore, 1979). Другие исследования с применением методов иммуногистохимии показывают, что несмотря на то, что морфологическая картина распределения норадренергических волокон в коре к 14-му дню постнатального развития соответствует таковой у половозрелых крыс, плотность их иннервации устанавливается лишь к концу третьей недели постнатального онтогенеза (Latsari et al., 2002). С помощью количественного анализа, проведенного в настоящем исследовании, показано, что плотность ТГ-положительных волокон с возрастом имеет тенденцию к увеличению в областях коры, относящихся к лимбической системе. Таким образом, полученные нами данные косвенно иллюстрируют этот феномен.

В соответствии с отмеченным ранее, для сенсомоторной коры характерна другая морфологическая картина: в данной области сохраняются относительно постоянные значения плотности волокон с первой недели постнатального онтогенеза и до взрослого возраста с последующим резким увеличением этих значений при старении. Интересно, что в остальных изученных областях в ходе нормального старения не наблюдается видимых морфологических и морфометрических изменений. При этом, общая интенсивность окрашивания срезов головного мозга старых животных в сравнении с половозрелыми, снижается.

Можно предположить, что это изменение может быть компенсаторными и связанными с уменьшением общего числа катехоламинергических нейронов в ходе старения. Одним из процессов, развивающихся в ходе старения, является усиление окислительного стресса. Окислительный стресс, по-видимому, в большей степени влияет на области, связанные с контролем движений (Cardozo-Pelaez et al., 1999; Norrara et al., 2018). Нейродегенеративный процесс развивается в ходе аутоокислительного процесса при образовании радикалов, которые в конечном итоге ухудшают биохимическое, физиологическое и морфологическое состояние тканей (Finkel, Holbrook, 2000; Luo, Roth, 2004). Поэтому представляется логичным возникновение компенсаторных механизмов, препятствующих развивающимся в ходе старения нейродегенеративным процессам.

И наоборот, увеличение плотности ТГ-положительных волокон может быть признаком развивающихся когнитивных нарушений. Так, например, увеличение количества глутаматергических пресинапсов в лобных долях коры положительно коррелировало с ухудшением когнитивных функций у пациентов со слабыми когнитивными нарушениями (Bell et al., 2007). Хотя это интересное наблюдение, его физиологические и поведенческие последствия для организма еще недостаточно изучены. Известно, что уровни катехоламинов положительно регулируются такой сигнальной молекулой как глиальный нейротрофический фактор (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) (Arenas et al., 1995; Zaman et al., 2003; Grondin et al., 2019). Исследование Матсунаги и соавт. показало, что при старении уровень экспрессии GDNF в лобной коре увеличивается (Matsunaga et al., 2006), что может способствовать росту волокон, и, таким образом, может частично объяснить наблюдаемое увеличение плотности катехоламинергических отростков. Предполагается также возможным, что данное компенсаторное увеличение плотности волокон связано со снижением количества рецепторов катехоламинов на клетках-мишенях при старении (Weiss et al., 1979). Отдельно необходимо отметить тот факт, что ТГ-положительные отростки в сенсомоторной коре у половозрелых животных представлены, в основном, норадренергическими волокнами (Nomura et al., 2014). Однако, в связи с ограничениями метода, не представляется возможным проверить, сохраняется ли подобное медиаторное соотношение у стареющих крыс или, наоборот, рост волокон связан с активностью дофаминергической системы. Таким образом, данное наблюдение нуждается в дальнейших исследованиях.

Неожиданный результат, полученный нами в ходе исследования срезов на световом уровне, заставил нас предпринять дополнительную проверку с помощью анализа оптических срезов конфокального микроскопа, толщина которых задается с помощью программного обеспечения настройками сканирования. Таким образом, изображения, полученные с конфокального микроскопа, нивелируют возможные погрешности толщины изготовляемых парафиновых срезов, и сводит к минимуму связанное с этими погрешностями получение ложноположительных результатов. Поскольку описанные нами на световом уровне результаты воспроизводятся с применением высокоточных методов сканирующей конфокальной микроскопии, мы действительно можем полагать, что у катехоламинергических волокон сенсомоторной коры существуют свои структурные особенности, которые проявляются в ходе старения.

Что касается ТГ-иммунопозитивных нейронов, которые наблюдали в коре, то отмечается, что эти клетки присутствуют у разных видов (Berger et al., 1985; Satoh, Suzuki, 1990; Weihe et al., 2006), причем особенно многочисленны они в неокортексе человека (Benavides-Piccione, DeFelipe, 2007). У грызунов катехоламинергические нейроны обнаруживают в глубоких слоях кортекса на разных сроках раннего постнатального развития, включая 60-е сут, причем количество их достигает максимума к концу второй недели, и затем постепенно снижается (Berger et al., 1985; Satoh, Suzuki, 1990). По всей видимости, наличие этих клеток характерно для кортекса на любом сроке постнатального развития, а отсутствие их на срезах скорее связано с низкой частотой встречаемости у более взрослых животных по сравнению с 7-дневными. Предполагается, что снижение количества ТГ-иммунопозитивных клеток происходит не из-за программируемой клеточной гибели, а вследствие изменений количества базального уровня фермента, присутствующего в этих клетках. Также высказывается предположение, что по крайней мере некоторые клетки коры, продуцирующие тирозингидроксилазу принадлежат к субпопуляции кальретинин-содержащих ГАМК-ергических интернейронов (Asmus et al., 2008). Другие исследования показывают, что тирозингидроксилаза колокализуется в клетках кортекса с холиацетилтрансферазой (ХАТ) и вазоактивным интестинальным пептидом (ВИП) (Asmus et al., 2011). Подобная колоколазация, однако, по-видимому, нехарактерна для нейронов коры головного мозга человека (Asmus et al., 2016). Поскольку известно, что ХАТ, кальретинин и ВИП экспрессируют интернейроны, относящиеся к большой группе клеток, содержащих рецептор 5HT3a, а экспрессирующие кальретинин, но не ХАТ и ВИП – к соматостатин-содержащим интернейронам (Tremblay et al., 2016), можно полагать, что клетки, наблюдаемые нами в коре, относятся к двум крупнейшим систематическим группам ГАМК-ергических интернейронов коры мозга крысы.

ВЫВОДЫ

В настоящем исследовании проведена сравнительная характеристика катехоламинергической системы трех отделов коры головного мозга на протяжении постнатального онтогенеза.

Проанализированы различия между областями коры, относящимся к разным функциональным системам и установлено, что плотность катехоламинергических волокон в сенсомоторной коре возрастает при старении.

Наши результаты показывают, что при старении возрастает плотность катехоламинергических волокон в сенсомоторной коре. Этот процесс подразумевает изменения уровней катехоламинов (дофамина и норадреналина) в головном мозге и может оказывать влияние на связанные с когнитивными нарушениями поведенческие изменения, которые наблюдаются при старении.

В настоящем исследовании показано, что метод конфокальной микроскопии обладает более широкими возможностями для количественного анализа результатов иммуноцитохимического исследования и может использоваться для анализа распределения тирозингидроксилазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и институциональные (заключение № 1/20 от 27.02.2020 локального этического комитета ФГБНУ “ИЭМ”) принципы ухода и использования животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.А. Разенкова – взятие материала, проводка и заливка в парафиновые блоки, покраска препаратов, фотографирование и анализ препаратов, статистический анализ полученных препаратов, работа с рисунками, написание текста статьи.

Д.Э. Коржевский – дизайн эксперимента, работа с рисунками и написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баришполец В.В., Федотова Ю.О., Сапронов Н.С. Структурно-функциональная организация дофаминергической системы головного мозга // Эксп. клин. фармакол. 2009. Т. 72. № 3. С. 44–49.

Григорьев И.П., Алексеева О.С., Кирик О.В. и др. Распределение низкомолекулярных белков нейрофиламентов в поясной коре головного мозга крысы // Морфология. 2018. Т. 154. № 5. С. 7–12.

Калинина Т.С., Дыгало Н.Н. Развитие норадренергической системы мозга крыс после пренатального воздействия кортикостероном // Изв. Ак. Наук. Сер. биол. 2013. Т. 2013. № 4. С. 447–452.

Сухарева Е.В., Калинина Т.С., Булыгина В.В. и др. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 2. С. 212–219.

Сухорукова Е.Г., Алексеева О.С., Коржевский Д.Э. Катехоламинергические нейроны головного мозга млекопитающих и нейромеланин // Журн. эвол. биох. и физиол. 2014. Т. 50. № 5. С. 336–342.

Угрюмов М.В. Синтез моноаминов немоноаминергическими нейронами: иллюзия или реальность? // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2009. Т. 95. № 3. С. 273–282.

Areal L.B., Blakely R.D. Neurobehavioral changes arising from early life dopamine signaling perturbations // Neurochem. Int. 2020. V. 137. P. 104747.

Arenas E., Trupp M., Åkerud P. et al. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons *in vivo* // Neuron. 1995. V. 15. № 6. P. 1465–1473.

Asmus S.E., Anderson E.K., Ball M.W. et al. Neurochemical characterization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons in the developing rat cerebral cortex // Brain Res. 2008. V. 1222. P. 95–105.

Asmus S.E., Cocanougher B.T., Allen D.L. et al. Increasing proportions of tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons colocalize with choline acetyltransferase or vasoactive intestinal peptide in the developing rat cerebral cortex // Brain Res. 2011. V. 1383. P. 108–119.

Asmus S.E., Raghanti M.A., Beyerle E.R. et al. Tyrosine hydroxylase-producing neurons in the human cerebral cortex do not colocalize with calcium-binding proteins or the serotonin 3A receptor // J. Chem. Neuroanat. 2016. V. 78. P. 1–9.

Bell K.F.S., Bennett D.A., Cuello A.C. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 40. P. 10810–10817.

Benavides-Piccione R., DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex // J. Anat. 2007. V. 211. № 2. P. 212–222.

Berger B., Verney C., Febvret A. et al. Postnatal ontogenesis of the dopaminergic innervation in the rat anterior cingulate cortex (area 24). Immunocytochemical and catecholamine fluorescence histochemical analysis // Brain Res. 1985. V. 353. № 1. P. 31–47.

Berger B., Verney C., Gaspar P. et al. Transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in some neurons of the rat neocortex during postnatal development // Brain Res. 1985. V. 355. № 1. P. 141–144.

Bissonette G.B., Roesch M.R. Development and function of the midbrain dopamine system: What we know and what we need to // Genes Brain Behav. 2016. V. 15. № 1. P. 62–73.

Björklund A. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 21, Dopamine. Amsterdam: Elsevier, 1992. 418 p.

Bonnin A., Miguel R. de, Castro J.G. et al. Effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol on the fetal and early postnatal development of tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brain // J. Mol. Neurosci. 1996. V. 7. № 4. P. 291–308.

Brownstein M., Saavedra J.M., Palkovits M. Norepinephrine and dopamine in the limbic system of the rat // Brain Res. 1974. V. 79. № 3. P. 431–436.

Cardozo-Pelaez F., Song S., Parthasarathy A. et al. Oxidative DNA damage in the aging mouse brain // Mov. Disord. 1999. V. 14. № 6. P. 972–980.

Cools R. Role of dopamine in the motivational and cognitive control of behavior // Neuroscientist. 2008. V. 14. № 4. P. 381–395.

Fallon J. Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex // J. Neurosci. 1981. V. 1. № 12. P. 1361–1368.

Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. 2000. V. 408. № 6809. P. 239–247.

Gates M.A., Torres E.M., White A. et al. Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons // Eur. J. Neurosci. 2006. V. 23. № 5. P. 1384–1390.

Gogolla N. The insular cortex // Curr. Biol. 2017. V. 27. № 12. P. R580–R586.

Grondin R., Littrell O.M., Zhang Z. et al. GDNF revisited: A novel mammalian cell-derived variant form of GDNF increases dopamine turnover and improves brain biodistribution // Neuropharmacology. 2019. V. 147. P. 28–36.

Hamezah H.S., Durani L.W., Ibrahim N.F. et al. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions // Exp. Gerontol. 2017. V. 99. P. 69–79.

Kalinina T.S., Shishkina G.T., Dygalo N.N. Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by glucocorticoids in the perinatal rat brain is age-dependent // Neurochem. Res. 2012. V. 37. № 4. P. 811–818.

Kortz M.W., Lillehei K.O. Insular Cortex. FL: StatPearls Publishing, 2021.

Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V. et al. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // Eur. J. Histochem. 2015. V. 59. № 3. P. 5–9.

Latsari M., Dori I., Antonopoulos J. et al. Noradrenergic innervation of the developing and mature visual and motor cortex of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis // J. Comp. Neurol. 2002. V. 445. № 2. P. 145–158.

Levitt P., Moore R.Y. Development of the noradrenergic innervation of neocortex // Brain Res. 1979. V. 162. № 2. P. 243–259.

Livneh Y., Andermann M.L. Cellular activity in insular cortex across seconds to hours: Sensations and predictions of bodily states // Neuron. 2021. V. 109. P. 1–18.

Luo Y., Roth G.S. The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration // Antioxid. Redox Signal. 2004. V. 2. № 3. P. 449–460.

Matsunaga W., Isobe K., Shirokawa T. Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex // Neurosci. Res. 2006. V. 54. № 4. P. 313–318.

Nomura S., Bouhadana M., Morel C. et al. Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex // Front. Cell. Neurosci. 2014. V. 8. Article 247.

Norrara B., Fiuza F.P., Arrais A.C. et al. Pattern of tyrosine hydroxylase expression during aging of mesolimbic pathway of the rat // J. Chem. Neuroanat. 2018. V. 92. P. 83–91.

Ohara P.T., Granato A., Moallem T.M. et al. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat // J. Neurocytol. 2003. V. 32. № 2. P. 131–141.

Reynolds L.M., Flores C. Mesocorticolimbic dopamine pathways across adolescence: diversity in development // Front. Neural Circuits. 2021. V. 15. P. 94–111.

Reynolds L.M., Pokinko M., Torres-Berrío A. et al. DCC receptors drive prefrontal cortex maturation by determining dopamine axon targeting in adolescence // Biol. Psychiatry. 2018. V. 83. № 2. P. 181–192.

Rushworth M.F.S., Noonan M.A.P., Boorman E.D. et al. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making // Neuron. 2011. V. 70. № 6. P. 1054–1069.

Satoh J., Suzuki K. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the mouse cerebral cortex during the postnatal period // Brain Res. Dev. Brain Res. 1990. V. 53. № 1. P. 1–5.

Tremblay R., Lee S., Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits // Neuron. 2016. V. 91. № 2. P. 260–292.

Ugrumov M.V., Melnikova V., Ershov P. et al. Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-expressing neurons in the rat arcuate nucleus: ontogenesis and functional significance // Psychoneuroendocrinology. 2002. V. 27. № 5. P. 533–548.

Ugrumov M.V., Taxi J., Tixier-Vidal A. et al. Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cell bodies // Neuroscience. 1989. V. 29. № 1. P. 135–156.

Vogt B.A., Vogt L., Farber N.B. Cingulate cortex and disease models // The Rat Nervous System. N.Y.: Elsevier, 2004. Chapter 22. P. 705–727.

Voorn P., Kalsbeek A., Jorritsma-Byham B. et al. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat // Neuroscience. 1988. V. 25. № 3. P. 857–887.

Weihe E., Depboylu C., Schütz B. et al. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression // Cell. Mol. Neurobiol. 2006. V. 26. № 4. P. 657–676.

Weiss B., Greenberg L., Cantor E. Age-related alterations in the development of adrenergic denervation supersensitivity // Fed. Proc. 1979. V. 38. № 5. P. 1915–1921.

Zaman V., Li Z., Middaugh L. et al. The noradrenergic system of aged GDNF heterozygous mice // Cell Transplant. 2003. V. 12. № 3. P. 291–230.

Catecholaminergic Rat's Forebrain Structures in Early Postnatal Development and Aging

V. A. Razenkova[1, *] and D. E. Korzhevskii[1]

[1]Institute of Experimental Medicine, ul. Akad. Pavlova, 12, Saint Petersburg, 197376 Russia
**e-mail: valeriya.raz@yandex.ru*

The aim of the study was to investigate morphological changes that occur in cortical catecholaminergic forebrain structures of Wistar rats during postnatal development. Rat's forebrain sections at different stages of postnatal development (postnatal day 7, postnatal day 30, 4 to 6 months and 23 months) were studied using immunohistochemistry methods. It has been shown, that distinct cortical areas perform unique distribution of catecholaminergic fibers due to their functional features. Age-related changes in density of the distribution of catecholaminergic fibers were analyzed, and it has been stated that the density of catecholaminergic fibers in the sensorimotor cortex increases with aging. It has been demonstrated that confocal laser scanning microscopy offers a wide variety of opportunities for qualitative and quantitative analysis of immunohistochemical results and can be a useful tool for tyrosine hydroxylase distribution studies.

Keywords: tyrosine hydroxylase, forebrain, development, aging, immunohistochemistry

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 224–227

РЕГЕНЕРАЦИЯ

УДК 576

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ЧЕЛОВЕКА В ПОЛНОСЛОЙНОМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТЕ

О. Л. Черкашина[a], *, А. В. Косых[a], Е. И. Моргун[a], А. Л. Риппа[a], А. А. Цитрина[a], А. П. Эттингер[b], Э. С. Чермных[a], Е. П. Калабушева[a], Е. А. Воротеляк[a]

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

[b] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия*

**e-mail: olgalcher@gmail.com*

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.
После доработки 14.12.2021 г.
Принята к публикации 18.12.2021 г.

Ксенотрансплантация кожи человека мышам с иммунодефицитом является одной из наиболее адекватных моделей для изучения механизмов регенерации и, таким образом, открывает широкие перспективы для исследований в областях современной клеточной биологии и регенеративной медицины. Разработанная в нашей лаборатории модель ксенотрансплантации полнослойного кожного лоскута позволила нам впервые описать динамику восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки человека. Исследована экспрессия и активация белка YAP1 в ходе регенерации эпидермиса, волосяных фолликулов (ВФ), папиллярной дермы (ПД), на основе чего были сделаны предположения о характере некоторых клеточных и молекулярных процессов в ходе регенерации кожи человека.

Ключевые слова: регенерация кожи, ксенотрансплантация, волосяные фолликулы, эпидермис, папиллярная дерма, адипоциты, YAP1

DOI: 10.31857/S0475145022020100

ВВЕДЕНИЕ

Ксенотрансплантация кожи человека делает возможным изучение процессов регенерации в норме, при моделировании заболеваний или тестировании лекарственных препаратов. В работе была использована ранее разработанная нашим коллективом модель ксенотрансплантации полнослойного кожного лоскута человека (Kalabusheva et al., 2020). Подобный ксенотрансплантат позволяет изучать не только регенерацию эпидермиса, которая подробно рассмотрена в ранее опубликованных работах (например, Kappes et al., 2004), но и исследовать динамику восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки, а также морфологию волосяных фолликулов, которые ранее изучались преимущественно на клетках и тканях лабораторных животных (например, Chermnykh et al., 2018; Vsevolodov et al., 2021). Отдельной областью интереса в нашем исследовании было изучение активации сигналинга YAP1 в различных структурах кожи человека в ходе регенерации. Повышенный процент клеток с ядерной локализацией YAP1 коррелирует с гиперпролиферативным и воспалительным фенотипом (Jia et al., 2018), в то же время снижение его экспрессии связывают с хроническими незаживающими ранами (Yu et al., 2017). Применение модели ксенотрансплантации полнослойного лоскута кожи человека позволит исследовать экспрессию и активность YAP1 как в эпидермисе и ВФ, так и в различных слоях дермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоптаты кожи волосистой части головы были получены из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов. Полнослойные кожные лоскуты трансплантировали мышам линии NOD/SCID (Charles River Laboratories); всего в работе использовали 15 животных, мышей содержали в SPF-условиях. Операции проводили по ранее разработанному и описанному в нашей лаборатории протоколу (Kalabusheva et al., 2020). Забор материала проводили на 40, 75 и 110 сут после трансплантации для получения криосрезов. Криосрезы использовали для окрашивания гематоксилин-эозином (BioVitrum), а также иммуногистохимического окрашивания (используемые

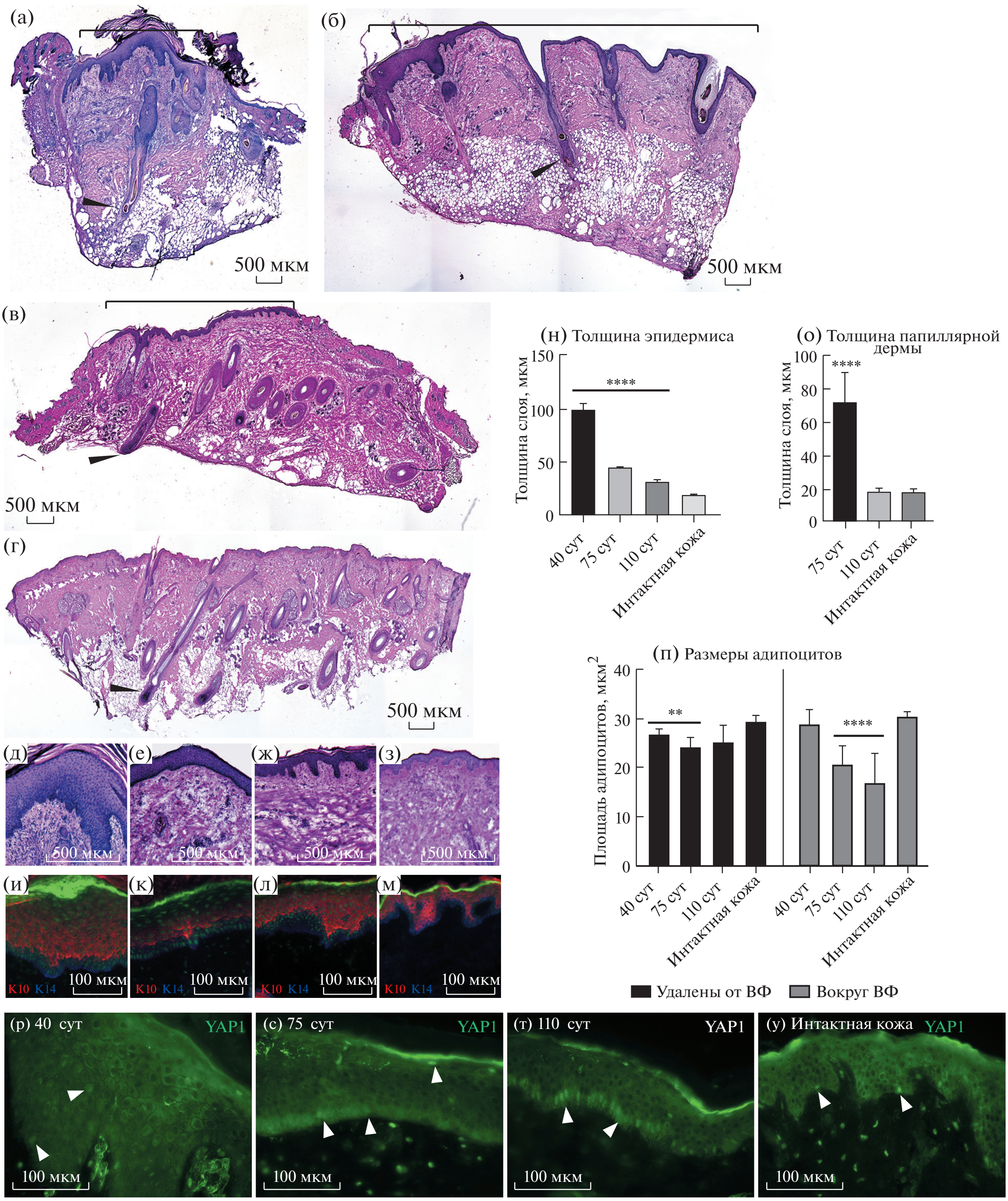

Рис. 1. Морфология кожи человека после ксенотрансплантации на 40 (а), 75 (б) и 110 (в) сут (скобками отмечены границы трансплантата), (г) – интактная кожа, стрелками отмечены ВФ, масштабный отрезок – 500 мкм. (д–з) – увеличенные фрагменты препаратов (а–г) соответственно, масштабный отрезок – 500 мкм. (и–м) – окрашивание на Кератин 10 (красный), Кератин 14 (синий), Human Nuclei (зеленый), масштабный отрезок – 100 мкм. (н–п) – измерение морфологических параметров трансплантированной кожи, ** – $p < 0.01$, **** – $p < 0.0001$ относительно интактной кожи. (р–с) – YAP1 в эпидермисе и ПД человека. Стрелками отмечены примеры YAP1-положительных ядер. Масштабный отрезок – 100 мкм.

антитела: cytokeratin 14, ab181595, Abcam, 1 : 1000; keratin 10, MA1-06319, Thermofisher, 1 : 200; YAP1, ab52771, Abcam, 1 : 300, Human Nuclei, MAB1281A4, Merck, 1 : 100). Фотографии получали на микроскопе Keyence BZ-9000 и Leica DMI 6000. Измерения проводили с использованием программного обеспечения ImageJ и Cell Profiler. Для проведения попарных сравнений в программе GraphPad Prism использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Данные на графиках представлены в виде медианы с разбросом в виде 95% доверительного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантат успешно интегрируется в ткани мыши, сохраняются эпидермис, дерма и подкожная жировая клетчатка кожи человека (рис. 1а–1г).

Эпидермис в ксенотрансплантате утолщен (рис. 1д–1з), особенно в течение первого месяца после трансплантации. Хотя его толщина значительно уменьшается от 40 сут к 110-м, она не достигает толщины эпидермиса интактной кожи (рис. 1н). Такая тенденция наблюдается как при измерении его общей толщины, так и при анализе базального и шиповатого слоев на основе иммуногистохимического выявления кератина 10 и 14 (рис. 1и–1м). Низкая скорость регенерации эпидермиса может быть обусловлена нарушением микроокружения, в норме формируемого иммунными клетками.

ВФ на 40 сут находятся на стадии раннего анагена, на 110 сут они продуцируют стержни волоса и морфологически соответствуют стадии среднего анагена. Регенерация фолликулов несколько замедленна в сравнении с моделью трансплантации единичных ВФ (Oh et al., 2016), что объясняется большим размером трансплантата в нашей работе.

Дерма на 40 сут теряет морфологическое разделение на папиллярный и ретикулярный слои, содержит воспалительный инфильтрат (рис. 1а). Папиллярный слой выявляется на 75 сут, к 110 сут морфология дермы полностью соответствует интактной коже (рис. 1в, 1г, 1о). В исследованиях на мышах показали, что фибробласты ретикулярной дермы формируют пул миофибробластов на ранних этапах регенерации, далее фибробласты ПД мигрируют в область повреждения, взаимодействуют с эпидермальными кератиноцитами и контролируют ремоделирование внеклеточного матрикса (Woodley, 2017), что соответствует динамике восстановления дермы человека, выявленной в нашей работе.

Исследования, проведенные на лабораторных животных, выявили вовлеченность клеток жировой ткани в миграцию фибробластов в область повреждения (Schmidt et al., 2013), а также в регуляцию цикла ВФ (Rivera-Gonzalez et al., 2014). В ксенотрансплантате размер адипоцитов подкожной жировой клетчатки меньше значений, полученных для интактной кожи. В области, прилежащей к ВФ, наблюдается выраженная тенденция к уменьшению размера адипоцитов от 40 суток к 110 (рис. 1п). Аналогичные изменения наблюдали на мышах при переходе от стадии цикла ВФ от раннего анагена к среднему (Rivera-Gonzalez et al., 2014), что воспроизводится в нашей модели. В интактной коже фолликулы находятся на стадии позднего анагена, поэтому адипоциты обладают большим размером.

Экспрессию YAP1 выявили на всех анализируемых сроках в эпидермисе, дерме и ВФ. В фолликулах он имел выраженную активную ядерную локализацию во внешнем корневом влагалище независимо от стадии цикла, что соответствует ранее опубликованным результатам (Elbediwy et al., 2016). В эпидермисе и ПД ядерная локализация YAP1 встречалась в единичных клетках на 40 и 75 сут после трансплантации (рис. 1р, 1с). В ходе регенерации при эпителизации раны YAP1 имеет преимущественно ядерную локализацию в эпидермисе. Поскольку наша модель не имеет оформленного раневого ложа, мы наблюдаем единичные клетки в эпидермисе, однако повышенную экспрессию YAP1 в ПД на 40 сут (рис. 1р). На 110 сут кератиноциты базального слоя эпидермиса имеют активную форму YAP1 с ядерной локализацией, в то время как папиллярные фибробласты обладают только неактивной формой с цитоплазматической локализацией. Интересно, что подобный паттерн распределения встречается именно на поздних сроках регенерации, и его появление вероятно коррелирует с завершением стадии ремоделинга ксенотрансплантата и активацией резидентных иммунных клеток человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была описана динамика восстановления эпидермиса, дермы, подкожной жировой клетчатки человека в ксенотрансплантате в течение длительного срока – 110 сут. Выявлено, что динамика восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки соответствует процессам, описанным ранее на лабораторных животных. Выявленный паттерн экспрессии и активности YAP1 указывает на значительные отличия ксенотрансплантированной кожи от интактной, что следует исследовать в дальнейшем в контексте иммунного статуса ксенотрансплантированной кожи.

БЛАГОДАРНОСТИ

ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН за доступ к флуоресцентным микроскопам Keyence BZ-9000 и Leica DMI 6000.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-30015.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение эксперимента одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных этического комитета по клиническим исследованиям РНИМУ им. Пирогова (номер заявки 17А+2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.П. Калабушева и Э.С. Чермных разрабатывали модель трансплантации, Е.П. Калабушева, А.В. Косых, А.П. Эттингер проводили манипуляции с мышами, проводили забор материала. А.Л. Риппа подготовила криосрезы для гистологического исследования. О.Л. Черкашина и Е.И. Моргун проводили гистологическое окрашивание препаратов. О.Л. Черкашина проводила обработку и анализ результатов. О.Л. Черкашина, Е.П. Калабушева и Е.А. Воротеляк участвовали в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Chermnykh E.S., Kiseleva E. V., Rogovaya O.S., Rippa A.L., Vasiliev A. V., Vorotelyak E.A. Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue // Histol. Histopathol. 2018. V. 33. № 11. P. 1189–1199.

Elbediwy A., Vincent-Mistiaen Z.I., Spencer-Dene B. et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis // Development. 2016. V. 143. № 10. P. 1674.

Jia J., Li C., Yang J. et al. Yes-associated protein promotes the abnormal proliferation of psoriatic keratinocytes via an amphiregulin dependent pathway // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 1–11.

Kalabusheva E.P., Rippa A.L., Tsitrina A.A. et al. Xenotransplantation of a full-layer human skin strip as a model for studying skin regeneration and the hair follicle cycle // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 52. № 1. P. 42–52.

Kappes U., Schliemann-Willers S., Bankova L. et al. The quality of human skin xenografts on SCID mice: a non-invasive bioengineering approach // Br. J. Dermatol. 2004. V. 151. № 5. P. 971–976.

Oh J.W., Kloepper J., Langan E.A. et al. A guide to studying human hair follicle cycling *in vivo* // J. Invest. Dermatol. 2016. V. 136. № 1. P. 34.

Rivera-Gonzalez G., Shook B., Horsley V. Adipocytes in skin health and disease // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2014. V. 4. № 3.

Schmidt B.A., Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing // Development. 2013. V. 140. № 7. P. 1517–1527.

Vsevolodov E.B., Mussayeva A.S., Latypov I.F. et al. Some paradoxical phenomena in hair follicle histophysiology // Russ. J. Dev. Biol. 2021 521. 2021. V. 52. № 1. P. 9–15.

Woodley D.T. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: Implications for wound healing // Dermatol. Clin. 2017. V. 35. № 1. P. 95–100.

Yu J., Choi S., Um J. et al. Reduced expression of YAP in dermal fibroblasts is associated with impaired wound healing in type 2 diabetic mice // Tissue Eng. Regen. Med. 2017. V. 14. № 1. P. 49–55.

Modeling the Regeneration of Human Skin and Hair Follicles in a Full-Thickness Xenograft

O. L. Cherkashina[1, *], A. V. Kosykh[1], E. I. Morgun[1], A. L. Rippa[1], A. A. Tsitrina[1], A. P. Oettinger[2], E. S. Chermnykh[1], E. P. Kalabusheva[1], and E. A. Vorotelyak[1]

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

[2]*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: olgalcher@gmail.com*

Xenotransplantation of human skin to immunodeficient mice is one of the most representative models for studying the mechanisms of regeneration and, thus, expands perspectives for research in modern cell biology and regenerative medicine. The full-thickness skin strip xenotransplantation model developed in our laboratory allowed us to describe the dynamics of restoration of the human dermis and panniculus carnosus. Pattern of the expression and activation of the YAP1 protein during the regeneration of the epidermis, hair follicles (HF), papillary dermis (PD) enabled us to make the conclusions about the basis of some cellular and molecular processes involved into the regeneration of human skin.

Keywords: skin regeneration, xenotransplantation, hair follicles, epidermis, papillary dermis, adipocytes, YAP1

ОНТОГЕНЕЗ, 2022, том 53, № 3, с. 228–238

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

УДК 591,3

ГЕНЕТИКА АТАВИЗМА

© 2022 г. В. П. Корж[a], *, Е. В. Гасанов[a]

[a] Институт молекулярной и клеточной биологии в Варшаве, ул. Князя Тройдена, 4, Варшава, 02-109 Польша

*e-mail: vkorzh@iimcb.gov.pl

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.
После доработки 24.01.2022 г.
Принята к публикации 30.01.2022 г.

Атавизмы с давних времен привлекали внимание людей. Сперва они будили воображение и представляли плодотворную почву для мифов и суеверий. С развитием науки они стали предметом научного интереса, и вскоре результаты исследования атавизмов вошли в виде доказательств в теорию эволюции. И все же на молекулярном уровне их появление оставалось недостаточно исследованным. Недавний прогресс сравнительной геномики и молекулярной биологии развития привел к пониманию процесса, лежащего в основе проявления одного из атавизмов человека – рудиментарного хвоста.

Ключевые слова: полителия, гипертрихоз, рудиментарный хвост (*Brachyury*)

DOI: 10.31857/S0475145022030041

“We are all mutants. But some of us are more mutant than others”.
Armand Marie Leroi, Mutants: On Genetic Variety and the Human Body

ВВЕДЕНИЕ

По определению Вильгельма Ру, в биологии термин “атавизм” определяет возрождение биологической структуры, которая была утрачена предшественниками в ходе эволюции (Correns et al., 1912). Термин “атавизм”, введенный в 1766 г. французским ботаником Дюшеном, происходит от латинского *atavis*, что примерно соответствует такому понятию как “предшественник” (Hall, 2010; Zanni, Opitz, 2013). У человека известен ряд атавизмов: дальтонизм, лишние соски, увеличенные зубы, удлиненный копчик – “хвост”, избыток волос и т.д. Существование атавизмов является большой проблемой для креационистов, оспаривающих эволюцию. Атавизмы – это тот непреодолимый аргумент теории эволюции, который противоречит основной идее креационизма о том, что животные и растения существуют в неизменном виде с момента создания.

Атавизм следует отличать от рудимента – признака или органа, постепенно в процессе эволюции теряющего ту функцию, что он выполнял у предков. Рудимент, хоть и имеет проявление недоразвитого признака или органа, но в противовес атавизму в норме широко представлен у особей данного вида. Примерами рудимента могут служить так называемые “зубы мудрости” человека – задние коренные зубы, большую часть жизни не несущие функциональной нагрузки и отстающие в развитии, остатки волосяного покрова на теле, несмотря на разную степень выраженности в популяции, нигде не несущие теплоизоляционной функции шерсти, и мышцы головы, ответственные за движения ушных раковин. Все эти органы и признаки как-то использовались давними предками, но утратили свою функцию в ходе эволюции человека. При этом термин “рудимент” трактуется шире, обозначая любой, не обязательно присутствующий в норме, недоразвитый и нефункциональный признак или орган. Ниже этот термин используется именно в таком значении.

Выше уже упоминалось, что атавизмы известны не только у человека, но и у растений и животных. Некоторые авторы полагают, что даже рак может быть своеобразной формой клеточного атавизма, поскольку представляет собой возврат клеток в их более примитивную форму предкового квази-одноклеточного фенотипа (Lineweaver et al., 2021). Эта довольно экзотичная идея, как нам кажется, незаслуженно популярна в современной научной литературе. Что касается публикаций на тему эволюции на клеточном уровне, то среди них можно найти и концептуально противоположную точку зрения, согласно которой опухоли выступают в качестве испытательного полигона для эволюции новых генов (Kozlov, 2010; Matyunina et al., 2019). Тем не менее, мы предпочитаем рассматривать атавизм с точки зрения биологии развития. Этот подход был детально исследован авторами, следующими по стопам Вильгельма Ру, и определяющими атавизм как “возникновение биологической структуры” (Zanni, Opitz, 2013; Tubbs et al., 2016).

Далеко не все аномалии развития, часто называемые атавизмами, таковыми являются. Примером может служить гипердонтия – появление дополнительного зуба или зубов, чаще всего постоянных (Rallan et al., 2013; Belmehdi et al., 2018). Однако у предков человека дополнительных, тем более непарных зубов не было. Именно поэтому данная аномалия развития, являющаяся следствием повышенной активности факторов роста в дентальной пластинке, не может быть признана проявлением утраченной в ходе эволюции вида биологической структуры, т.е. атавизмом.

Тот факт, что биологическая структура или функция были утрачены, не обязательно означает, что вместе с ней были утрачены гены, ответственные за формирование этой структуры. Часто утрата биологической функции связана с изменением регуляция экспрессии этих генов. Например, экспрессия гена может быть полностью или частично выключена из-за эпигенетического влияния на регуляторную область, определяющую экспрессию гена, например, на уровне энхансеров или посредством вставки мобильных генетических элементов, таких как транспозоны, в регуляторную часть генома. Известный американский изобретатель Т.А. Эдисон (1847–1931) однажды сказал: “Чтобы изобретать, нужно иметь хорошее воображение и кучу хлама”. Очевидно, у природы было в достатке хорошего воображения и хватало времени на то, чтобы, покопавшись в большой куче некодирующей ДНК (98.5% генома человека), состоящей в основном из транспозонов, регуляторных и повторяющихся последовательностей, найти некоторым из них какое-то, полезное с точки зрения эволюции, применение. Например, один из неавтономных мобильных элементов – *Alu*-элемент существует в более чем 1 млн копий, что по оценкам составляет 11% генома человека. В связи с этим было высказано предположение, что размножение в геноме мобильных элементов играет важную роль в видообразовании (Kazazian, 2004). В процессе эволюции многие транспозоны приобрели функциональную роль регуляторных элементов. В частности, они используются в качестве энхансеров (Oliver, Green, 2009).

В доказательство того, что Эдисон был прав, после детального исследования транспозонов, их выделения и модификации они превратились в эффективные векторы для доставки ДНК в геномы модельных животных. В настоящее время именно таким образом транспозоны широко используются при создании трансгенных животных и мутантов. Встраивание такого транспозона в геном не только вносит новую наследственную информацию. Этот процесс зачастую нарушает структуру ДНК и функцию генов в месте встраивания транспозона (инсерции; Корж, 2008; Korzh, 2007; Kawakami, 2007; Sivasubbu et al., 2007). Удаление такого транспозона под воздействием активной транспозазы (белка, инициирующего транспозицию мобильного элемента) или геномного стресса часто приводит к перемещению (ремобилизации) транспозона, что может восстановить функцию гена, утраченную в результате инсерции (Parinov et al., 2004; Urasaki et al., 2006; Kondrychyn et al., 2009). Такая ремобилизация могла бы вернуть клетки, ткань, орган в состояние, близкое тому, что существовало в организме предков до того, как интеграция транспозона в геном предка вызвала нарушение функции гена и запустила эволюционные изменения.

Намеки на существование причинно-следственных связей между атавизмами и генами начали появляться еще до того, как стала ясна молекулярная природа гена. Хуже было с пониманием молекулярных механизмов. Во-первых, количество атавизмов довольно ограничено даже у относительно хорошо изученного вида, такого как человек (Gaskill, Marlin, 1989). Во-вторых, генетические модификации могут происходить в некодирующих участках генома, которые, по сравнению с кодирующими участками, гораздо менее изучены. И все же, эта ситуация постепенно начинает меняться и, прежде всего, потому что число видов и особей одного и того же вида, геномы которых секвенированы, лавинообразно растет.

Принимая во внимание принцип канализации развития Уоддингтона, вполне вероятно, что подобные атавистические фенотипы могут возникнуть в результате изменений экспрессии или мутаций более чем одного гена. Например, хорошо известно, что естественная мутация или экспериментальная инактивация функции нескольких генов позвоночных животных и насекомых, которые регулируют развитие глаз (*Pax6*, *Eya*, *Six3*, *Hh*), приводят к одному и тому же результату – отсутствию глаз (Gehring, 2011; Shaham et al., 2012). Таким образом, результат сверхэкспрессии “мастера-регулятора” Pax6/eyeless, который вызывает развитие эктопических глаз у позвоночных и беспозвоночных (Holder et al., 1995; Chow

Рис. 1. Редукция хвоста в процессе эволюции произошла несколько раз, первый раз у амфибий, а среди млекопитающих у грызунов и человекообразных обезьян.

et al., 1999), хорошо вписывается в предполагаемую схему развития, согласно которой экспрессия одного гена может определять набор регуляторных взаимодействий, приводящих к образованию функционального органа, в данном случае глаза. Логично, что мутация с потерей функции таких генов могла бы приводить к редукции или утрате органа (рис. 1), а восстановление функции гена или генов – если не к полному, то хотя бы частичному восстановлению органа.

В процессе развития один и тот же результат может быть достигнут различными способами. Например, слепота у пещерной рыбы может быть вызвана увеличением экспрессии гена *Shh* во время эмбриогенеза за счет эпигенетической регуляции, вызванной повышенным метилированием регуляторных областей этого гена (Yamamoto et al., 2004; Gore et al., 2018). Известно, что увеличение активности *Shh* влечет за собой увеличение экспрессии *Pax2* за счет экспрессии *Pax6*, критически важного мастера-регулятора развития глаза (Macdonald, Wilson, 1996). У слепого голого землекопа тот же результат, по-видимому, достигается комбинацией нескольких инактивирующих мутаций, влияющих на иные гены, такие как *Cryba4* и *Crybb3* (Kim et al., 2011).

Чтобы придать некий порядок сложной и весьма запутанной паутине молекулярных взаимодействий, ответственных за образование специфических тканей и органов, было предложено понятие сети регуляции генов (СРГ). СРГ состоит “в основном из функциональных связей между регуляторными генами, которые продуцируют факторы транскрипции, и их целевыми цис-регуляторными модулями в других регуляторных генах вместе с генами, которые экспрессируют пространственно важные сигнальные компоненты” (Davidson, Erwin, 2006). *Pax6* относится к одной из таких эволюционно консервативных СРГ: Pax-Six-Eya-Dach (PSEDN; Bessarab et al., 2004; Galli-Tsinopoulou et al., 2014). По всей вероятности, потеря в эволюции функции генов, от которых зависит активность СРГ, может выражаться посредством формирования рудимента – уменьшения и последующего исчезновения органа (рис. 1), а восстановление активности СРГ – в форме атавизма.

Этот пример иллюстрирует то, что современная биология развития достигла важного рубежа. Накоплено достаточно знаний о структурах, представляющих различные атавизмы, и генах, участвующих в этом процессе, для того чтобы исследователи могли не только предположить какие из изменений экспрессии генов могут вызвать атавизм, но и проверить эти предположения в эксперименте. Возможно, результаты этих экспериментов помогут более глубоко осознать молекулярные механизмы, лежащие в основе проявления атавизмов? Может быть, они представят собой отправную точку дальнейшего анализа истории эволюции живого на этой планете? А может предоставят дополнительные аргументы в долгом споре эволюционистов и креационистов? Ответы на эти вопросы каждый может попытаться сформулировать сам. И если иметь в виду последствия упомянутой выше “канализации” Уоддингтона, становится ясно, что проверка всех потенциальных генов-кандидатов даже при использовании современных методов высокопроизводительного анализа может занять значительное время. Тем не менее, в последнее время наблюдается прогресс в установлении при-

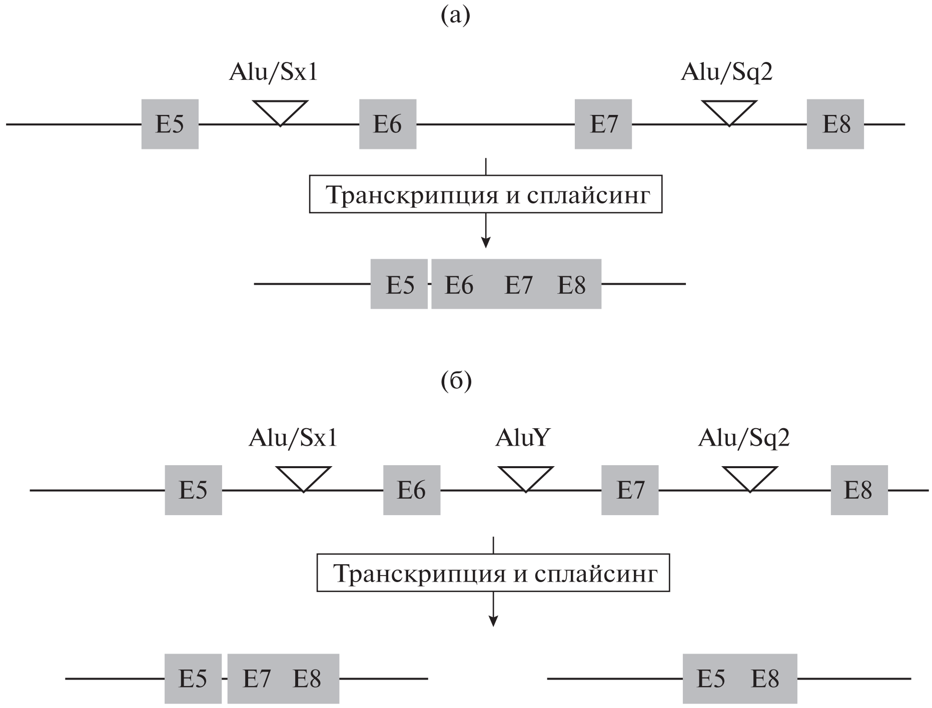

Рис. 2. Вставка мобильного элемента *AluY* в интрон между 6 и 7 экзонами гена *BRACHYURY* (*TBXT*) у предков человекообразных обезьян вызвала нарушение сплайсинга и понижение уровня трансляции *TBXT*, что в свою очередь запустило процесс редукции хвоста у потомков этой группы животных и в том числе у человека. (а) – предковое состояние, (б) – гоминиды.

чинно-следственных связей между атавизмами и изменениями экспрессии некоторых генов, что и является предметом дальнейшего обсуждения на примере трех различных атавизмов.

ПОЛИТЕЛИЯ (ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СОСКИ)

В отличие от большинства млекопитающих, имеющих несколько сосков (до 25–27 у опоссумов), у приматов, в том числе у человека, обычно имеется только два соска. Поэтому появление дополнительных сосков у людей рассматривается как возврат к более примитивной эволюционной форме, т.е. как атавизм. Следует отметить, что множественные соски у людей проявляются не так уж редко (от 0.2 до 5.6%) (Galli-Tsinopoulou, Stergidou, 2014).

Анализ раннего этапа формирования молочных желез был проведен Борисом Балинским в лаборатории Уоддингтона в конце 1940-х годов (Balinsky, 1949–1950, 1950), а роль наследственных факторов в этом процессе была продемонстрирована Литтлом и Макдональдом (Little, McDonald, 1965). У мышей линии A/J количество молочных желез (и сосков) отличается от 5 пар, канонических для мышей. Генетический локус, ответственный за эту вариацию, был назван *scaramanga* (*Ska*, в честь одного из персонажей фильма о Джеймсе Бонде – "Человек с золотым пистолетом"). Этот локус был связан с активностью лиганда Erbb4–Nrg3, который, как известно, действует в качестве сигнала клеточной дифференцировки для зачатков молочной железы у млекопитающих (Howard et al., 2005). Nrg3 и компоненты связанного с Nrg3 сигнального каскада могут претендовать на роль фактора или факторов развития, регулирующих полителию у человека, но это еще предстоит доказать экспериментально.

ГИПЕРТРИХОЗ (ЧРЕЗМЕРНОЕ КОЛИЧЕСТВО ВОЛОС)

У людей иногда развивается избыток волос – состояние, известное как гипертрихоз. У некоторых индивидуумов образуются эктопические участки оволосения, у других волосы покрывают все тело настолько впечатляюще, что изображение одной из особ – Тогнины Гонсалвус – было использовано в качестве первой страницы популярной книги "Мутанты" А.М. Леруа, переделанной в 2004 г. в документальный фильм Би-би-си "Мутанты человека". Леруа перефразировал известный афоризм Джорджа Оруэлла "Все животные равны, но некоторые из них более равны, чем остальные", для демонстрации того, что все человечество является мутантами. Именно версия Леруа, использованная в качестве эпиграфа к этому обзору, отражает роль мутаций в формировании генетической разнородности популяции человека.

Гипертрихоз может быть вызван различными наследственными факторами, начиная от тех, что ответственны за аномальную нейруляцию (Pax3), и заканчивая сохранением рудиментарных (эмбриональных) волос "лануго" (Sales et al., 2021). С гипертрихозом связаны несколько генетических аномалий, и среди них большие внутрихромосомные вставки в интервале в 1.8×10^6 пар нуклеотидов между генами *FGF13* и *SOX3* на X-хромосоме (Zhu et al., 2011; DeStefano et al., 2013). Учитывая, что один и тот же фенотип может быть вызван разными вставками, вполне вероятно, что область места вставки, а не сама вставка, имеет решающее значение для возникновения такого фенотипа. Принимая во внимание половой диморфизм по этому признаку у человека (усы, борода у мужчин и т.п.), кажется закономерным, что элементы регуляции уровня оволосения расположены именно на половой X-хромосоме. В данной области содержится несколько генов, кодирующих различные белки и микроРНК. Некоторые из этих генов (*SOX3*, *SPANXB1*, *SPANXC*) регулируют развитие мужских зародышевых клеток, тогда как другие (*MCF2*) связаны с развитием опухоли гранулярных клеток кожи (https://www.uniprot.org/uniprot/).

У костистых рыб гомолог одного из этих генов — *zic3* существует в виде пары генов с родственным *zic6*, потеря которого в процессе эволюции иллюстрирует точку разрыва хромосомы между этими двумя генами (Parinov et al., 2004; Kondrychyn et al., 2013; Winata et al., 2018). Это может быть одной из причин отсутствия *Zic6* у наземных животных. Все эти факты наводят на мысль о том, что участок генома между *FGF13* и *SOX3* представляет собой "горячую" точку хромосомных перестроек, включая внутрихромосомные инсерции, хромосомные деления и слияния. Следует иметь в виду, что некоторые гены, находящиеся в этом интервале, играют важную роль в формировании общего плана тела или в поддержании жизненно важных функций. FGF13 действует в качестве регулятора сердечных натриевых каналов Nav1.5, Nav 1.6 и, как таковой, вероятно, участвует в регуляции сердечного ритма (Poon et al., 2016; Wang et al., 2017; Minhas et al., 2021), а ZIC3 регулирует асимметрию тела (Purandare et al., 2002; Bellchambers et al., 2021). Как эти функции сочетаются с регуляцией паттерна волосяного покрова, пока неясно. Посему природа генов и механизм их действия, вызывающие гипертрихоз, все еще остаются загадочными.

РУДИМЕНТАРНЫЙ ХВОСТ ЧЕЛОВЕКА

Эта статья не имела бы смысла, если бы в ней не нашлось места для примера, четко доказывающего связь между восстановлением эволюционно архаичной структуры (или атавизмом) и генетической активностью. Таким примером может служить рудиментарный (нефункциональный) хвост человека. В отношении этого атавизма вот-вот должны быть опубликованы новые данные. При этом следует отметить, что в отношении хвоста связь с некоторыми из генов уже давно была довольно очевидна. Однако потребовались усилия нескольких поколений биологов-эволюционистов и невероятные возможности, предоставленные секвенированием всего генома у разных видов, чтобы эту связь доказать.

Эта история началась в 1921 г., когда Надежда Добровольская-Завадская (1878—1954) начала работать под руководством профессора Клода Рего (1870—1940) в лаборатории Пастера института Кюри в Париже. Она провела первый в истории эксперимент по радиационному мутагенезу млекопитающих (мышей), в котором были получены несколько наследственных мутаций с определенным фенотипом. Одна из мутаций, представленная делецией, в гомозиготном состоянии вызывала летальный исход, а у гетерозигот формировался укороченный хвост. Отсюда название мутации — *Brachyury* (из греческого, "короткий хвост"; Dobrovolskaïa-Zavadskaïa, 1927). История этого открытия была описана в деталях (Корж, 2001; Korzh and Grunwald, 2001). Напомним, что суммируя свои исследования мутантов *Brachyury*, Добровольская-Завадская писала в 1934 г., что анализ мутанта позволил сформулировать вопрос о генетическом механизме, ответственном за развитие хвоста. Морфологические исследования этого отклонения от нормы привели ее к предположению о существовании генов, ответственных за развитие хвоста. Такие гены действуют как основные специфические регуляторы развития хвоста, которые инструктируют процесс формирования этого органа. В процессе органогенеза гены, подобные *Brachyury*, взаимодействуют и сотрудничают с дополнительными генами-модификаторами (Dobrovolskaïa-Zavadskaïa et al., 1934). Легко заметить, как подставив в это утверждение вместо *Brachyury Pax6*, получаем гипотезу о роли Pax6 в качестве основного регулятора развития другого органа — глаза.

В своих выводах, сделанных на основании серии исследований *Brachyury*, Добровольская-Завадская значительно опередила развитие науки того времени. Насколько ценным было открытие этого мутанта для формирования биологии развития как науки, можно судить из следующего. Понадобилось еще 10 лет дальнейших исследований *Brachyury*, прежде чем были сформулированы основополагающие принципы биологии развития (Gluecksohn-Schoenheimer, 1944). Исследования *Brachyury* всегда находились на переднем крае радиационной и молекулярной биологии, генетики, биологии развития, кристаллографии. *Brachyury* был позиционно клонирован первым из генов, регулирующих развитие млекопитающих (Herrmann et al., 1990). Brachyury был одним из первых транскрипционных факторов млекопитающих, для которых с помощью рентгеноструктурного анализа была определена пространственная структура (Müller, Herrmann, 1997). У рыбки данио первой из мутаций, для которой была показана связь с геном, оказалась делеционная мутация *no tail* (*ntl*), которая затрагивает ген данио *tbxta*, гомологичный *Brachyury* (Schulte-Merker et al., 1994). Естественные мутанты *Brachyury* выявлены также у домашних животных, таких как мэнские кошки (Buckingham et al., 2013), многие породы собак (bobbed-tailed dogs), например, собственно, бобтейл и корги (Hytönen et al., 2009). Значительная редукция или полное отсутствие хвоста показаны и у диких животных, например, тенрека (*Tenrec ecaudatus*), крылана Темминка (*Megaerops ecaudatus*), грызунов капибары (*Hydrochoerus hydrochaeris*), агути (*Dasyprocta*), хомяков (Cricetinae) и морской свинки (*Cavia porcellus*). Можно ожидать, что в ближайшее время причина бесхвостости может быть проанализирована именно у морских свинок, последовательность генома которых известна. Также следует отметить, что не у всех пород собак с врожденным укорочением хвоста найдена мутация в гене *tbxt*/*Brachyury* (Hytönen et al., 2009). Это лишний раз подтверждает разветвленность СРГ и возможность достижения схожего фенотипа при мутации различных, входящих в ее состав генов.

Исследуя формирование каудальной области позвоночника у человека, анатомы развития показали, что в развитии человека количество сомитов достигает максимума на 16-ой стадии Карнеги – 39–41 пара сомитов. Позже это число уменьшается вследствие запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) пяти пар сомитов в хвостовой области (Tojima et al., 2018). Таким образом была подготовлена почва для того, чтобы связать биологические предпосылки развития хвоста у млекопитающих с эволюционными теориями и подкрепить эти материалы молекулярными доказательствами.

Представим себе на мгновение, что в наше время студент биоинформатики пишет диплом и решил изучить все гены, связанные с нарушениями развития хвоста. Это сравнительно несложно с учетом того, что известны многие мутации, нарушающие эволюционно консервативные элементы молекулярного механизма развития хвоста у модельных животных, таких как данио и мышь. Оказалось, что такой студент может легко идентифицировать все эти гены (Tickey-McCrane et al., 2017). В этом списке: *Wnt3a*, *Tbx6*, *T*/*Brachyury* (*TBXT*), *Msgn1*, *Tbx16*, *Hox10*, *Hox11*, *Hox13*, *Ptf1a*, *Cyp26a1*, *CXCR2*, *Ets1/2*, *Fgfr1*, *Fgf8*, *Fgf24*, *Cdx1*, *Dld*, *Ph2-alfa*, *Noggin*. Первые четыре гена являются наиболее вероятными кандидатами на роль генов, дефицит функции которых вызывает отсутствие хвоста. *Wnt3a*, *Tbx6* и *Msgn1* – три критически важных фактора, которые инициируют образование параксиальной мезодермы, из которой развиваются позвонки, тогда как *T* или *Brachyury* (в 2018 году переименованный в *TBXT* для удобства биоинформатиков) действует в индукции пролиферации и дифференцировки клеток мезодермы хвоста и туловища. Мутант мыши *Wnt3a*, который фенокопирует *Brachyury*, был даже назван *vestigial tail* (или "рудиментарный хвост"), что дает достаточно точное представление о том, что автор этой статьи думал о роли мутированного гена в развитии хвоста (Heston, 1951). В ту пору этот ген был все еще гипотетическим. *Wnt3a* вновь переоткрыли как *int-4* (Nurse, Varmus, 1982), а клонировали в начале 1990х (Roelink, Nurse, 1991; Krauss et al., 1992; Nusse, Varmus, 2012).

Судя по всему, авторы диплома Tickey-McCrane 2017 г. были на правильном пути, сославшись на исследования хвостов обезьян Фуденом (Fooden, 1997) и предположив, что "макаки могут владеть ключом" к тайне хвоста человека. В отсутствие надежных данных, связывающих развитие рудиментарных хвостов человека с генами, принимающими участие в развитии, в статьях, посвященных этой теме, велась несколько умозрительная дискуссия на тему о том, какие из хвостов считать настоящими (содержащими позвонки), а какие псевдохвостами. Возможно, в своем анализе авторы дипломной работы следовали взглядам Дао и Нетски (Dao, Netsky, 1984) на природу хвоста человека, которые считали, что рудиментарные хвосты человека не содержат позвоночных структур в отличие от хвостов у хвостатых приматов. Напротив, детальный морфологический анализ показал, что некоторые рудиментарные хвосты человека содержат "дополнительные позвонки и соединены с кончиком копчика" (Sugamata et al., 1988). В любом случае, строгое определение "истинного" хвоста человека в последнее время было подвергнуто ревизии и предложено считать, что любой хвост является истинным (Tubbs et al., 2016).

И уж совсем недавно оказалось, что для ответа на вопрос о том, какой из генов ответственен за формирование рудиментарного хвоста у человека, понадобилось сравнить эволюцию генов, участвующих в развитии хвоста у хвостатых и бесхвостых (человекообразных) обезьян. Недавний препринт, который, вероятно, будет опубликован ко времени публикации этого текста, связал рудиментарный хвост человека с эволюционными изменениями в экспрессии *Tbxt* (*T*, *Brachyury*), вызванными вставкой *AluY* – одного из наиболее распространенных мобильных элементов в геноме человека – в интрон 6 между экзонами 6 и 7 *TBXT* предка всех человекообразных обезьян, включая людей (рис. 2). Именно это событие, по всей вероятности, положило начало цепи эволюционных адаптаций, которые привели к отсутствию хвоста у человекообразных обезьян и человека (Xia et al., 2021). В процессе транскрипции *AluY*, вероятно, образует пару со вторым мобильным элементом *AluSx1* в противоположной ориентации, присутствующим в соседнем 5-м интроне. Это приводит к формированию пространственного комплекса мРНК *TBXT*, состоящего из стебля и петли. Петля заключает в себе экзон 6 *TBXT*, что вызывает формирование альтернативного транскрипта *TBXT*-Δ*exon6* с частичной потерей активности TBXT. После того как вставка *AluY* запустила процесс эволюционной адаптации, короткий хвост мог, с одной стороны, оказаться неблагоприятным фактором для обитания в трехмерной среде, а с другой – поспособствовать передвижению на двух ногах. Дополнительные модификации этого механизма, вероятно, вызвали не только закрепление этого признака, но и дальнейшее уменьшение хвоста.

В данном случае пролить свет на роль укорочения хвоста в эволюции может сравнение собакоголовых (Cercopithecoidea) и человекообразных (Hominoidea) обезьян. Разделение этих групп произошло, вероятно, незадолго до или сразу после перехода к преимущественно наземному образу жизни, связанному с возникновением саванн и разреженных лесов вместо части джунглей Африки около 25 млн лет назад (Andrews, 1992; Senup, 2016). При этом собакоголовые обезьяны (например, павианы) сохранили как хвост, так и квадрупедальную локомоцию, тогда как человекообразные, даже вернувшись к преимущественно древесному образу жизни (гиббоны, шимпанзе, орангутанги), используют брахиацию (лазание с помощью рук) и несут другие признаки первичной бипедальности. Вероятно, отсутствие хвоста и двуногое хождение имеют прямую связь, возникнув в линии человекообразных на заре их формирования, однако не являются ограничением для древесного образа жизни, лишь меняя характер используемой для этого локомоции.

Предлагаемый молекулярный механизм редукции хвоста был успешно воспроизведен у трансгенных мышей после введения *AluY* в *Brachyury* мышей в то же самое положение, что у приматов. Это не только предоставило необходимое экспериментальное доказательство того, что интеграция *AluY* в *TBXT* отвечает за редукцию хвоста, но и значительно расширило наши представления о роли транспозонов в эволюции. Таким образом исследования *Brachyury*, первого гена, изменение экспрессии которого, вероятно, запустило эволюционные изменения редукции хвоста у млекопитающих, вновь оказались на переднем фронте биологии развития – науки, которая возникла в значительной степени благодаря открытию *Brachyury* в 1927 г. Надеждой Добровольской-Завадской.

Важно отметить, что исследование Xia et al. (2021) наводит на мысль о роли дополнительных факторов развития, таких как гормон щитовидной железы (тиреоидный гормон, ТГ) и ретиноевая кислота (РК) в развитии задней части тела. Для этого необходимо в комплексе рассмотреть несколько вопросов. Не исключено, что роль *AluY* не ограничивается нарушением сплайсинга. Возможно, такие мобильные элементы выполняют дополнительные регуляторные функции. Известно, что ТГ вызывает резорбцию хвоста во время метаморфоза у шпорцевой лягушки (Tata, 1968, 2006), тогда как РК несет ответственность за снижение экспрессии *Wnt-3a*, еще одного потенциального регулятора развития хвоста, мутации которого приводят к укорачиванию хвоста мышей, что напоминает синдром каудальной регрессии (Padmanabhan et al., 1998; Iulianella et al., 1999; Shum et al., 1999). Известно также, что *Alu*-повторы содержат сайты связывания факторов транскрипции, зависимых от ТГ и РК (ядерных рецепторов гормонов) (hormone-response elements, HRE). Каноническим HRE для ТГ-РК является нуклеотидная последовательность AGGTCA, которая часто присутствует в *Alu*-элементах в двух или более копиях, разделенных промежутком из двух или четырех нуклеотидов. Многие встречающиеся в природе HRE отличаются от этого мотива одним или несколькими нуклеотидами (Vansant et al., 1995; Piedrafita et al., 1996). Возможно, инсерция *AluY* не только нарушает сплайсинг *TBXT*, но также, посредством дополнительной регуляции на уровне связывания ядерных рецепторов, изменяет характер ТГ-РК-зависимых процессов развития, например, резорбцию тканей под действием ТГ или экспрессию Wnt-3a в зоне действия *TBXT*, что вносит дополнительный уровень регуляции редукции хвоста.

По всей вероятности, ответы на эти интригующие вопросы будут даны в ближайшем будущем.

Учитывая мощь современной биоинформатики, легко предсказать, что публикация (Xia et al., 2021) запустит процесс активного пересмотра данных в области биологии развития, относящихся к мутантным фенотипам, напоминающим те или иные атавизмы. В сочетании с применением сравнительной геномики это позволит расшифровать молекулярные механизмы разных атавизмов. Само же изучение генетики атавизмов позволяет, как видно из примеров выше, лучше понять пути эволюции видов, включая наиболее для нас интересный – человека. И, хотя проявление атавизмов явление довольно редкое, однако наводит на мысль, что, несмотря на то, что все мы мутанты, некоторые из нас, незначительное меньшинство, по крайней мере морфологически чуть менее мутанты, чем большинство.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта, финансированного грантами Опус Национального Научного Центра (ННЦ), Польша, № 2016/21/B/NZ3/00354 и № 2020/39/B/NZ3/02729.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием животных или людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор В.П. Корж предложил концепцию и написал первый вариант статьи. Автор Е.В. Гасанов существенно дополнил и развил эволюционный аспект работы. Оба автора работали над последней версией и одобрили ее.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Корж В.П. Н.А. Добровольская-Завадская и открытие гена T // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 3. С. 234–237.

Корж В. Поиск тканеспецифических регуляторных элементов с помощью транспозона Tol2 как пример эволюционного синтеза геномики и биологии развития // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 94–99.

Andrews P. Evolution and environment in the Hominoidea // Nature. 1992. V. 360. P. 641–646. https://doi.org/10.1038/360641a0

Balinsky B. On the developmental processes in mammary glands and other epidermal structures // Transactions of the Royal Society Edinburgh. 1949–1950. V. 62. P. 1–31.

Balinsky B.I. On the prenatal growth of the mammary gland rudiment in the mouse // J. Anat. 1950. V. 84. P. 227–235. PMID: 15436328.

Bellchambers H.M., Ware S.M. Loss of Zic3 impairs planar cell polarity leading to abnormal left-right signaling, heart defects and neural tube defects // Hum. Mol. Genet. 2021. V. 30. P. 2402–2415. PMID: 34274973. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab195

Belmehdi A., Bahbah S., El Harti K. et al. Non syndromic supernumerary teeth: management of two clinical cases // Pan Afr. Med. J. 2018. V. 29. P. 163. PMID: 30050627; PMCID: PMC6057571. https://doi.org/10.11604/pamj.2018.29.163.14427

Buckingham K.J., McMillin M.J., Brassil M.M. et al. Multiple mutant T alleles cause haploinsufficiency of Brachyury and short tails in Manx cats // Mamm. Genome. 2013. V. 24. P. 400–408. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23949773; PMCID: PMC3848309. https://doi.org/10.1007/s00335-013-9471-1

Chow R.L., Altmann C.R., Lang R.A. et al. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate // Development. 1999. V. 126(19). P. 4213–4222. PMID: 10477290.

Correns C., Fischel A., Kuster E. Terminologie der Entwicklungsmechanik der Tiere und Pflanzen / Ed. Roux W. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1912.

Davidson E.H., Erwin D.H. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans // Science. 2006. V. 311. P. 796–800. PMID: 16469913. https://doi.org/10.1126/science.1113832

Dao A.H., Netsky M.G. Human tails and pseudotails // Hum Pathol. 1984. V. 15. P. 449–453. PMID: 6373560. https://doi.org/10.1016/s0046-8177(84)80079-9

DeStefano G.M., Fantauzzo K.A., Petukhova L. et al. Position effect on FGF13 associated with X-linked congenital generalized hypertrichosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 7790–7795. PMID: 23603273; PMCID: PMC3651487. https://doi.org/10.1073/pnas.1216412110

Dobrovolskaïa-Zavadskaïa N. Etudes sur les effets produits par les rayons X dans le testicule de la Souris // Arch. de Anat. Micr. 1927. V. 23. P. 396–438.

Dobrovolskaïa-Zavadskaïa N., Kobozieff N., Veretennikoff S. Etude morphologique et genetique de la brachyourie chez les descendants de souris a testicules irradies // Arch de Zool. Exp. 1934. V. 76. P. 249–358.

Fooden J. Tail length variation in *Macaca fascicularis* and *M. mulatta* // Primates. 1997. V. 38. P. 221–231. https://doi.org/10.1007/BF02381611

Halder G., Callaerts P., Gehring W.J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila* // Science. 1995. V. 267. P. 1788–1792. PMID: 7892602. https://doi.org/10.1126/science.7892602

Hall B.K. Atavisms // Curr Biol. 2010. V. 20:R871. PMID: 20971424. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.002

Heston W.E. The “vestigial tail” mouse; a new recessive mutation // J. Hered. 1951. V. 42. P. 71–74. PMID: 14832454. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106167

Howard B., Panchal H., McCarthy A. et al. Identification of the scaramanga gene implicates Neuregulin3 in mammary gland specification // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 2078–2090. PMID: 16140987; PMCID: PMC1199577. https://doi.org/10.1101/gad.338505

Galli-Tsinopoulou A., Stergidou D. Polythelia: simple atavistic remnant or a suspicious clinical sign for investigation? // Pediatr. Endocrinol. Rev. 2014. V. 11. P. 290–297. PMID: 24716395.

Gaskill S.J., Marlin A.E. Neuroectodermal appendages: the human tail explained // Pediatr. Neurosci. 1989. V. 15. P. 95–99. PMID: 2635301. https://doi.org/10.1159/000120450

Gehring W.J. Chance and necessity in eye evolution // Genome Biol. Evol. 2011. V. 3. P. 1053–1066. PMID: 21979158; PMCID: PMC3227406. https://doi.org/10.1093/gbe/evr061

Gore A.V., Tomins K.A., Iben J. et al. An epigenetic mechanism for cavefish eye degeneration // Nat. Ecol. Evol. 2018. V. 2. P. 1155–1160. PMID: 29807993; PMCID: PMC6023768. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0569-4

Gluecksohn-Schoenheimer S. The development of normal and homozygous Brachy (T/T) mouse embryos in the extraembryonic coelom of the chick // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1944. V. 30. P. 134–140.

Iulianella A., Beckett B., Petkovich M. et al. A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation // Dev. Biol. 1999. V. 205. P. 33–48. PMID: 9882496. https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9110

Kawakami K., Sato S., Ozaki H. et al. Six family genes—structure and function as transcription factors and their roles in development // Bioessays. 2000. V. 22. P. 616–626. PMID: 10878574. https://doi.org/10.1002/1521-1878(200007)22:7<616::AID-BIES4>3.0.CO;2-R

Kawakami K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates // Genome Biol. 2007. V. 8. Suppl. 1:S7. PMID: 18047699; PMCID: PMC2106836. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7

Kazazian H.H. Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. 2004. V. 303. P. 1626–32. PMID: 15016989. https://doi.org/10.1126/science.1089670

Kim E.B., Fang X., Fushan A.A. et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat // Nature. 2011. V. 479. P. 223–227. PMID: 21993625; PMCID: PMC3319411. https://doi.org/10.1038/nature10533

Kondrychyn I., Garcia-Lecea M., Emelyanov A. et al. Genome-wide analysis of Tol2 transposon reintegration in zebrafish // BMC Genomics. 2009. V. 10. P. 418. PMID: 19737393; PMCID: PMC2753552. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-418

Kondrychyn I., Teh C., Sin M. et al. Stretching morphogenesis of the roof plate during coordinated formation of the central canal // PLoS One. 2013. V. 8. P. e56219. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056219

Korzh V., Grunwald D. Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa and the dawn of developmental genetics // Bioessays. 2001. V. 23. P. 365–371. PMID: 11268043. https://doi.org/10.1002/bies.1052

Korzh V. Transposons as tools for enhancer-trap screens in vertebrates // Genome Biol. 2007. V. 8 (Suppl. 1): S8. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-S1-SN

Kozlov A.P. The possible evolutionary role of tumors in the origin of new cell types // Med. Hypotheses. 2010. V. 74. P. 177–185. PMID: 19665850. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.07.027

Krauss S., Korzh V., Fjose A. et al. Expression of four zebrafish wnt-related genes during embryogenesis // Development. 1992. V. 116. P. 249–259. PMID: 1483391.

Lineweaver C.H., Bussey K.J., Blackburn A.C. et al. Cancer progression as a sequence of atavistic reversions // Bioessays. 2021. V. 43. e2000305. Epub 2021 May 13. PMID: 33984158. https://doi.org/10.1002/bies.202000305

Little C.C., McDonald H. Abnormalities of the mammae in the house mouse // J. Hered. 1965. V. 36. P. 285–288.

Matyunina E.A., Emelyanov A.V., Kurbatova T.V. et al. Evolutionarily novel genes are expressed in transgenic fish tumors and their orthologs are involved in development of progressive traits in humans // Infect Agent Cancer. 2019. V. 14:46. https://doi.org/10.1186/s13027-019-0262-5

Macdonald R., Wilson S.W. Pax proteins and eye development // Curr. Opin. Neurobiol. 1996. V. 6. P. 49–56. PMID: 8794051. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80008-0

Minhas R., Loeffler-Wirth H., Siddiqui Y.H. et al. Transcriptome profile of the sinoatrial ring reveals conserved and novel genetic programs of the zebrafish pacemaker // BMC Genomics. 2021. V. 22. P. 715. PMID: 34600492; PMCID: PMC8487553. https://doi.org/10.1186/s12864-021-08016-z

Müller C.W., Herrmann B.G. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor // Nature. 1997. V. 389. P. 884–888. PMID: 9349824. https://doi.org/10.1038/39929

Nusse R., Varmus H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome // Cell. 1982. V. 31. P. 99–109. PMID: 6297757. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3

Nusse R., Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed // EMBO J. 2012. V. 31. P. 2670–2684. PMID: 22617420; PMCID: PMC3380217. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.146

Oliver K.R., Greene W.K. Transposable elements: powerful facilitators of evolution // Bioessays. 2009. V. 31. P. 703–714. PMID: 19415638. https://doi.org/10.1002/bies.200800219

Padmanabhan R. Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus // Reprod. Toxicol. 1998. V. 12. P. 139–151. PMID: 9535508. https://doi.org/10.1016/s0890-6238(97)00153-6

Parinov S., Kondrichin I., Korzh V. et al. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo* // Dev. Dyn. 2004. V. 231.

P. 449–459. PMID: 15366023.
https://doi.org/10.1002/dvdy.20157

Piedrafita F.J., Molander R.B., Vansant G. et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 14412–14420. PMID: 8662930.
https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14412

Poon K.L., Liebling M., Kondrychyn I. et al. Development and properties of the cardiac conduction system in zebrafish // Gene Expression Patterns. 2016. V. 21. P. 89–96. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27593944.
https://doi.org/10.1016/j.gep.2016.08.003

Purandare S.M., Ware S.M., Kwan K.M. et al. A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in Zic3 mutant mice // Development. 2002. V. 129. P. 2293–2302. PMID: 11959836.

Rallan M., Rallan N.S., Goswami M. et al. Surgical management of multiple supernumerary teeth and an impacted maxillary permanent central incisor // BMJ Case Rep. 2013. V. 2013:bcr2013009995. PMID: 23704467; PMCID: PMC3670037.
https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009995

Roelink H., Nusse R. Expression of two members of the Wnt family during mouse development–restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube // Genes Dev. 1991. V. 5. P. 381–388. PMID: 2001840.
https://doi.org/10.1101/gad.5.3.381

Saleh D., Yarrarapu S.N.S., Cook C. Hypertrichosis. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. PMID: 30521275.

Schulte-Merker S., van Eeden F.J., Halpern M.E. et al. no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene // Development. 1994. V. 120. P. 1009–1015. PMID: 7600949.

Senut B. Morphology and environment in some fossil Hominoids and Pedetids (Mammalia) // J. Anat. 2016. V. 228. P. 700–715. PMID: 26712383; PMCID: PMC4804138.
https://doi.org/10.1111/joa.12427

Shaham O., Menuchin Y., Farhy C. et al. Pax6: a multi-level regulator of ocular development // Prog. Retin. Eye Res. 2012. V. 31. P. 351–376. PMID: 22561546.
https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.04.002

Shum A.S., Poon L.L., Tang W.W. Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo // Mech. Dev. 1999. V. 84. P. 17–30. PMID: 10473117.
https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00059-3

Sivasubbu S., Balciunas D., Amsterdam A. et al. Insertional mutagenesis strategies in zebrafish. Genome Biol. 2007. V. 8. Suppl. 1 (Suppl. 1):S9. PMID: 18047701; PMCID: PMC2106850.
https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s9

Sugamata A., Sato M., Ikeda J. et al. Two cases of a true human tail // Jpn. J. Plast. Reconstr. Surg. 1988. V. 31. P. 1072.

Tata J.R. Early metamorphic competence of *Xenopus larvae* // Dev. Biol. 1968. V. 18. P. 415–440. PMID: 5704418.
https://doi.org/10.1016/0012-1606(68)90050-x

Tata J.R. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone // Mol. Cell. Endocrinol. 2006. V. 246. P. 10–20. PMID: 16413959.
https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.024

Tickey-McCrane S., Dunsworth H., Wegener J. Investigating the Genetic Basis for Hominoid Taillessness. Senior Honors Projects. 2017. P. 533.

http://digitalcommons.uri.edu/srhonorsprog/533

Tojima S., Makishima H., Takakuwa T., Yamada S. Tail reduction process during human embryonic development // J. Anat. 2018. V. 232. P. 806–811. PMID: 29315541; PMCID: PMC5879970.
https://doi.org/10.1111/joa.12774

Tubbs R.S., Malefant J., Loukas M. et al. Enigmatic human tails: A review of their history, embryology, classification, and clinical manifestations // Clin. Anat. 2016. V. 29. P. 430–438. PMID: 26990112.
https://doi.org/10.1002/ca.22712

Vansant G., Reynolds W.F. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 8229–3823. PMID: 7667273; PMCID: PMC41130.
https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8229

Urasaki A., Morvan G., Kawakami K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition // Genetics. 2006. V. 174. P. 639–649. PMCID: 16959904; PMCID: PMC1602067.
https://doi.org/10.1534/genetics.106.060244

Wang X., Tang H., Wei E.Q. et al. Conditional knockout of Fgf13 in murine hearts increases arrhythmia susceptibility and reveals novel ion channel modulatory roles // J. Mol. Cell. Cardiol. 2017. V. 104. P. 63–74. PMID: 28119060; PMCID: PMC5637556.
https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.009

Winata C.L., Korzh V. Zebrafish Zic genes mediate developmental signaling // Adv. Exp. Med. Biol. 2018. V. 1046. P. 157–177. Jun Aruga (Eds): Zic family. 429143_ 1_En, (9) Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-7311-3_9

Xia B., Zhang W., Wudzinska A. et al. The genetic basis of tail-loss evolution in humans and apes // bioRxiv. 2021.09.14.460388.
https://doi.org/10.1101/2021.09.14.460388

Yamamoto Y., Stock D.W., Jeffery W.R. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish // Nature. 2004. V. 431. P. 844–847. PMID: 15483612.
https://doi.org/10.1038/nature02864

Zanni G., Opitz J.M. Annals of morphology. Atavisms: phylogenetic Lazarus? // Am. J. Med. Genet. A. 2013. V. 161A. P. 2822–2835. PMID: 24166815.
https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36234

Zhu H., Shang D., Sun M. et al. X-linked congenital hypertrichosis syndrome is associated with interchromosomal insertions mediated by a human-specific palindrome near SOX3 // Am. J. Hum. Genet. 2011. V. 88. P. 819–826. PMID: 21636067; PMCID: PMC3113246.
https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.004

Genetics of Atavism

V. P. Korzh[1,*] and E. V. Gasanov[1]

[1]*International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw, Ks. Trojdena 4, 02-109 Warsaw, Poland*

**e-mail: vkorzh@iimcb.gov.pl*

The atavisms interested people since the beginning of time. First, they excited imagination and created fertile grounds for myths and superstitions. As science started to develop, it became a subject of research, which soon enough yielded evidence to support evolutionary theory. And yet, at the molecular level the manifestation of atavisms has remained not fully understood. The recent progress of comparative genomics and molecular developmental biology helped to understand this process and its basis in the case of one of the human atavisms – the vestigial tail.

Keywords: polithelia (supernumerary nipples), hypertrichosis, vestigial tail (*Brachyury*)